

Untersuchung der Expression des Chemokinrezeptors CXCR4
in chemisch induzierten Bronchialkarzinomen in Mäusen

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Tobias Ronny Haage
geboren am 08.09.1993 in Erfurt

Gutachter:

1. apl. Prof. Dr. med. Amelie Lupp, Jena
2. Prof. Dr. phil. Gustav Jirikowski, Jena
3. Prof. Dr. med. Karl-Joachim Netter, Marburg

Tag der öffentlichen Verteidigung: 04.12.2018

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	4
2.1 Bronchialkarzinome	4
2.1.1 Nichtkleinzelliges Bronchialkarzinom	7
2.1.2 Kleinzelliges Bronchialkarzinom	7
2.1.3 Ätiologie und Pathogenese	9
2.1.4 Klinik, Diagnostik und Therapie	10
2.2 Chemokine und Chemokinrezeptoren	14
2.2.1 CXCR4/CXCL12-Achse	15
2.2.2 Signaltransduktion des CXCR4	17
2.2.3 CXCR4-Expression auf Tumorzellen	19
2.2.4 Antagonisierung des CXCR4	20
2.3 Murine Lungentumor-Modelle	22
2.3.1 NNK- und LPS-vermitteltes Lungentumor-Modell	24
2.3.2 Nikotin-abgeleitetes Nitrosamin-Keton NNK	25
2.3.3 Bakterielle Lipopolysaccharide	26
3 Ziele der Arbeit	27
4 Material und Methoden	28
4.1 Material	28
4.1.1 Mausstämme und Behandlung	28
4.1.2 Chemikalien und Lösungen	30
4.1.3 Verwendete Antikörper	32
4.1.4 Geräte und Verbrauchsmaterial	34
4.2 Methoden	35
4.2.1 Immunhistochemie an Paraffinschnitten	35
4.2.2 Hämatoxylin-Eosin-Übersichtsfärbung	37
4.2.3 Immunhistochemie an Free-Floating-Schnitten	39
4.2.4 In-situ-Hybridisierung	41
4.2.5 Auswertung und verwendete Computerprogramme	43
5 Ergebnisse	44
5.1 Pilotversuch zur Tumorinduktion mit NNK und LPS	44
5.1.1 Makroskopischer und mikroskopischer Tumornachweis	46

5.1.2	Auswertung der Immunhistochemie an Paraffinschnitten	47
5.1.2.1	Expression des CXCR4	47
5.1.2.2	Expression von eGFP	48
5.1.2.3	Expression von CXCL12/SDF-1	50
5.1.2.4	Expression von CD34	51
5.1.2.5	Expression von Chromogranin A.....	52
5.1.2.6	Expression von Ki-67	53
5.1.2.7	Expression des SSTR2	54
5.1.3	Auswertung der Immunhistochemie an Free-Floating-Schnitten.....	55
5.1.3.1	Expression des CXCR4	55
5.1.3.2	Expression von eGFP	57
5.1.3.3	Expression von CXCL12/SDF-1	57
5.1.3.4	Expression ausgewählter Immunzellmarker.....	58
5.1.3.5	Expression von CD34	61
5.1.3.6	Expression von Ki-67	62
5.1.4	Auswertung der In-situ-Hybridisierung	63
5.2	Pilotversuch zur Tumorinduktion mit LPS.....	65
5.3	Hauptversuch zur Erfassung der Wirkung von AMD3100	67
5.3.1	Mikroskopischer Tumornachweis	69
5.3.2	Auswertung der Immunhistochemie an Paraffinschnitten	70
5.3.2.1	Expression des CXCR4	70
5.3.2.2	Expression von eGFP	72
5.3.2.3	Expression von CXCL12/SDF-1	73
5.3.2.4	Expression von CD34	74
5.3.2.5	Expression von Chromogranin A.....	75
5.3.2.6	Expression von Ki-67	76
5.3.2.7	Expression des SSTR2	77
5.3.3	Auswertung der Immunhistochemie an Free-Floating-Schnitten.....	78
5.3.3.1	Expression des CXCR4	78
5.3.3.2	Expression von eGFP	79
5.3.3.3	Expression von CXCL12/SDF-1	79
5.3.3.4	Expression ausgewählter Immunzellmarker.....	82
5.3.3.5	Expression von CD34	83
5.3.3.6	Expression von Ki-67	85

6 Diskussion	87
6.1 Tumorinduktion mit NNK und LPS.....	87
6.2 Charakterisierung der Lungentumoren	90
6.2.1 Expression des CXCR4	90
6.2.2 Expression von eGFP	93
6.2.3 Expression von CXCL12/SDF-1.....	93
6.2.4 Expression ausgewählter Immunzellmarker.....	95
6.2.5 Expression von CD34	99
6.2.6 Expression von Chromogranin A	100
6.2.7 Expression von Ki-67	101
6.2.8 Expression des SSTR2.....	102
6.3 Antagonisierung des CXCR4 durch AMD3100.....	103
7 Schlussfolgerungen	105
8 Literatur- und Quellenverzeichnis.....	107
9 Anhang	VII
9.1 Abbildungsverzeichnis.....	VII
9.2 Tabellenverzeichnis.....	XI
9.3 Ehrenwörtliche Erklärung	XII
9.4 Danksagung	XIII

Abkürzungsverzeichnis

AEC	Aminoethylcarbazol
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
BAD	Bcl-2-Associated Death Promoter
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
CD	Cluster of Differentiation
CgA	Chromogranin A
CTP	Cytidintriphosphat
CXCL12	CXC-Motiv-Chemokinligand 12
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
CXCR7	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 7
DAG	Diacylglycerin
DAPI	Diamidinphenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
eGFP	enhanced Green Fluorescent Protein
FFM	Free-Floating-Methode
GDP	Guanosindiphosphat
GEKID	Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland
Gr-1	Granulocyte-differentiation antigen-1
GTP	Guanosintriphosphat
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIF-1 α	Hypoxie-induzierter Faktor 1 α
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
IHC	Immunhistochemie an Paraffinschnitten
IP ₃	Inositoltrisphosphat
JAK	Januskinase
LDL	Low Density Lipoprotein
LPP	Lambda-Protein-Phosphatase
LPS	Lipopolysaccharid
Ly6	Lymphocyte antigen 6
Mac-1	Macrophage-1-antigen
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kaskade

mRNA	messenger-RNA
mTORC1	mammalian Target of Rapamycin Complex 1
NF- κ B	Nuclear Factor ‚kappa-light-chain-enhancer‘ of activated B-cells
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NNAL	Nikotin-abgeleiteter Nitrosamin-Alkohol
NNK	Nikotin-abgeleitetes Nitrosamin-Keton
NSCLC	Nichtkleinzelliges Bronchialkarzinom (englisch: Non-Small-Cell Lung Cancer)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PECAM-1	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PKB	Proteinkinase B
RFP	Red Fluorescent Protein
RKI	Robert Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure
RSA	Rinderserumalbumin
SCLC	Kleinzelliges Bronchialkarzinom (englisch: Small-Cell Lung Cancer)
SD	Standardabweichung
SDF-1	Stromal Cell-Derived Factor 1
SSC	Standard-Sodium-Citrate
SSTR2	Somatostatin-Rezeptor 2
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
TIS	Carcinoma in situ, Tumor in situ
TNM	Klassifikation maligner Tumoren (Tumor, Nodus, Metastasen)
TPBS	Thiomersal mit PBS
TPBS-T	Thiomersal mit PBS und Triton X-100
UICC	Internationale Vereinigung gegen Krebs (französisch: Union Internationale Contre le Cancer)
UTP	Uridintriphosphat
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

1 Zusammenfassung

Neben Herz-Kreislauf-Erkrankungen gehören Krebserkrankungen zu den häufigsten Todesursachen in Deutschland. Den aktuellen Daten des Robert Koch-Instituts zufolge starben im Jahr 2012 etwa 220.000 Männer und Frauen an einer Krebserkrankung und hiervon circa 45.000 Menschen an den Folgen eines Bronchialkarzinoms. Da maligne Lungentumoren häufig erst in einem fortgeschrittenen Tumorstadium diagnostiziert werden, weisen Patienten mit einem Bronchialkarzinom noch immer eine geringe Überlebenszeit auf. Daher ist die Suche nach neuen Zielstrukturen für die Diagnostik und die Therapie von großer Bedeutung. Eine solche Zielstruktur könnte der Chemokinrezeptor CXCR4 darstellen, für welchen eine Überexpression in über 20 verschiedenen Tumorentitäten, unter anderem auch in Bronchialkarzinomen, nachgewiesen werden konnte. Dem CXCR4 wird dabei unter anderem eine wichtige Funktion bei der Neoangiogenese, der Proliferation, der Invasivität, der Metastasierung und der Chemotherapieresistenz zugeschrieben. Die Antagonisierung dieser CXCR4-vermittelten Effekte, beispielsweise mit dem nicht-peptidischen CXCR4-Antagonisten AMD3100 (Plerixafor), gilt daher als vielversprechender Therapieansatz in der Behandlung CXCR4-positiver Tumoren.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sollte das von Keohavong et al. (2011) erstmals beschriebene murine Lungentumor-Modell etabliert und genauer charakterisiert werden, um auf dessen Grundlage ein tierexperimentelles Modell für die Suche nach neuen Zielstrukturen für die Diagnostik und die Therapie maligner Lungentumoren zu schaffen. Dies wurde anhand der Expression des CXCR4 als mögliche zukünftige Zielstruktur überprüft. Die Tumorinduktion erfolgte hierbei durch eine kombinierte Verabreichung des Nitrosamin-Ketons NNK, einem Nikotin-Metaboliten, und von Lipopolysacchariden (LPS) gramnegativer Bakterien. Die Untersuchungen erfolgten an 24 sieben Wochen alten *Cxcr4-eGFP*-BAC-Mäusen und an 16 gleichaltrigen *Cxcl12-Cxcl12RFP/Cxcr4-eGFP*-BAC-Mäusen, die ein eGFP-Reportergen unter Kontrolle des murinen *Cxcr4*-Promotors exprimieren. Innerhalb der ersten vier Behandlungswochen wurden am ersten und dritten Tag der Woche jeweils zweimal 3 mg NNK, gelöst in 200 µl Natriumchlorid-Lösung, durch intraperitoneale Injektion und über einen Zeitraum von 17 Behandlungswochen jeweils einmal am ersten Tag der Woche 5 µg LPS, gelöst in 30 µl Phosphat-gepufferter Salzlösung, durch intranasale Instillation verabreicht. Nach erfolgter 17-wöchiger Tumorinduktion mit NNK und LPS erhielten drei der *Cxcl12-Cxcl12RFP/Cxcr4-eGFP*-BAC-Mäuse über einen Zeitraum von zwei Wochen

25 µg/h AMD3100, gelöst in Phosphat-gepufferter Salzlösung, durch eine osmotische Minipumpe. Die Lungengewebe der Versuchstiere beider transgenen Mauslinien wurden auf das Vorhandensein nichtkleinzelliger und kleinzelliger Lungentumoren untersucht und deren tumorspezifische CXCR4-Expression mithilfe der Anti-CXCR4-Antikörper UMB-2 und 2B11 sowie indirekt durch den Nachweis des eGFP erfasst. Darüber hinaus erfolgte die Charakterisierung der Lungentumoren durch die Expression des endogenen CXCR4-Liganden CXCL12/SDF-1, des Proliferationsmarkers Ki-67, des neuroendokrinen Tumormarkers Chromogranin A und des Somatostatin-Rezeptors SSTR2 sowie hinsichtlich der Expression von CD11b, CD31, CD34, CD68 und Gr-1 zur Abgrenzung CXCR4-exprimierender Immunzellen und Endothelzellen von Tumorzellen.

In den Lungengewebe aller zehn mit NNK und LPS behandelten *Cxcr4-eGFP-BAC*-Mäuse sowie der neun gleichermaßen und der drei zusätzlich mit AMD3100 behandelten *Cxcl12-Cxcl12RFP/Cxcr4-eGFP-BAC*-Mäuse gelang der Nachweis zahlreicher nichtkleinzelliger und kleinzelliger Lungentumoren. Außerdem konnte in einer von zwölf lediglich mit LPS behandelten *Cxcr4-eGFP-BAC*-Mäusen ein Lungentumor mit kleinzelliger Differenzierung festgestellt werden. Die unbehandelten Kontrolltiere zeigten keine Lungentumorentwicklung. Unabhängig von der transgenen Mauslinie und der Tumorentität konnten in den Lungentumorgewebe CXCR4-exprimierende Zellen nachgewiesen werden. Aufgrund der in den Tumorgewebe der nichtkleinzelligen Lungentumoren immunhistochemisch aufgezeigten Kongruenz der Expressionsmuster des CXCR4 und des CD34 sowie der Detektion intratumoral gelegener Monozyten, Alveolarmakrophagen und neutrophiler Granulozyten mit einer eGFP-Koexpression mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie, konnte eine tumorspezifische CXCR4-Expression in dieser Tumorentität nicht bestätigt werden. Kleinzellige Lungentumoren wiesen dagegen neben einer CXCR4-Expression, die nicht mit dem intratumoralen Vorhandensein von Immunzellen und Endothelzellen zu erklären war, auch eine deutliche Expression von Ki-67 und Chromogranin A auf. Eine Expression des Somatostatin-Rezeptors SSTR2 konnte in beiden Tumorentitäten nicht nachgewiesen werden. Trotz der aufgezeigten vollständigen Antagonisierung der CXCL12/SDF-1-vermittelten Aktivierung, Phosphorylierung und Internalisierung des CXCR4 in den Tumorzellen durch eine zweiwöchige Behandlung mit AMD3100 konnte kein Effekt der CXCR4-Antagonisierung auf die Proliferationsrate der Tumorgewebe, die Tumorgroße oder die Tumervaskularisation bewiesen werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich das von Keohavong et al. (2011) beschriebene, chemisch mit NNK und LPS induzierte Lungentumor-Modell als zuverlässiges tierexperimentelles Modell erwies. Der Nachweis einer tumorspezifischen CXCR4-Expression konnte in den kleinzelligen Bronchialkarzinomen erbracht werden, ohne dass hierbei jedoch ein therapeutischer Effekt durch eine CXCR4-Antagonisierung aufgezeigt werden konnte. Ob das fehlende Ansprechen der Lungentumoren auf AMD3100 in den vorliegenden Untersuchungen in dem noch frühen Tumorstadium, der relativ kurzen Behandlungsdauer oder dem Behandlungszeitpunkt begründet ist, sollte daher in nachfolgenden Untersuchungen weiter evaluiert werden.

2 Einleitung

2.1 Bronchialkarzinome

Das Bronchialkarzinom stellt eine maligne Neoplasie der Bronchien oder Bronchiolen epithelialen Ursprungs dar. Makroskopisch werden entsprechend ihrer Lokalisation zentrale, periphere und bronchoalveoläre Karzinome unterschieden. Dagegen erfolgt die histopathologische Einteilung in kleinzellige (SCLC, englisch: Small-Cell Lung Cancer) und nichtkleinzellige Bronchialkarzinome (NSCLC, englisch: Non-Small-Cell Lung Cancer) primär gemäß der Tumorzellgröße.

Maligne Tumoren der Lunge sind weltweit die am häufigsten auftretende Krebsart und die hauptsächliche Krebstodesursache. Betroffen sind vor allem entwickelte Länder Nordamerikas und Europas, seltener Entwicklungsländer, wobei dort ebenfalls eine Zunahme der Erkrankungshäufigkeit zu verzeichnen ist. In Deutschland ist das Bronchialkarzinom, gemessen an allen Krebsneuerkrankungen, die zweithäufigste Krebserkrankung bei Männern nach dem Prostatakarzinom und die dritthäufigste Krebserkrankung bei Frauen nach Tumoren in Brustdrüse und Darm (RKI und GEKID 2015). Die Neuerkrankungsrate in Deutschland belief sich im Jahr 2012 auf rund 35.000 Männer und 18.000 Frauen. In demselben Jahr betrug die Mortalität etwa 30.000 bei Männern und 15.000 bei Frauen mit einem Altersgipfel zwischen 80 und 84 Jahren. Dadurch repräsentieren maligne Lungenerkrankungen auch in Deutschland die häufigste Krebstodesursache mit einem Anteil von 25 %. Die 5-Jahres-Überlebensrate des Bronchialkarzinoms entspricht in Deutschland aktuell 14 % bei Männern und 19 % bei Frauen und ist maßgeblich vom Tumorstadium zum Zeitpunkt der Diagnose und von der Tumorentität abhängig (Goeckenjan et al. 2011, Ridge et al. 2013). Die geschlechtsabhängig gegenläufige Entwicklung altersstandardisierter Erkrankungs- und Sterberaten innerhalb der letzten 20 Jahre mit einem Anstieg bei Frauen um 30 % und einem Rückgang bei Männern um 20 % wird durch eine seit längerem beobachtete Veränderung des Rauchverhaltens erklärt (RKI und GEKID 2013).

Mit Hilfe des TNM-Systems lassen sich Bronchialkarzinome nach ihrem Krankheits- und Ausbreitungsstadium klassifizieren. Die TNM-Klassifikation gilt als international anerkannter Standard und umfasst im Wesentlichen die Beurteilung des Primärtumors (T), das Vorhandensein befallener Lymphknoten (N) sowie das Auftreten oder Fehlen von Metastasen (M), wobei sich jede dieser Klassen in weitere Subklassen

gliedert. Unter anderem für das Bronchialkarzinom wurde diese Einteilung 2010 durch die Internationale Vereinigung gegen Krebs (UICC, französisch: Union Internationale Contre le Cancer) aktualisiert.

Die Charakterisierung des Primärtumors erfolgt nach dem Durchmesser in der Längsachse oder der direkten Ausdehnung in benachbarte Strukturen (Mirsadraee et al. 2012). Bei einem Nachweis maligner Zellen im Sputum oder in Bronchialsputumlösungen, aber fehlender Visualisierung durch Bildgebung oder Bronchoskopie, ist die Beurteilung des Tumors nicht möglich (Tx). Ist das Karzinom auf dessen Ursprungsgewebe begrenzt und die Basalmembran durch ein nicht-invasives Tumorstadium noch intakt, so beschreibt dies ein Carcinoma in situ (TIS). Das weitere T-Staging wird anhand der Tumorstadiumgröße vorgenommen (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: T0- bis T4-Staging des Bronchialkarzinoms

T-Staging	
T0	keine Evidenz eines Primärtumors
T1	Tumorstadiumgröße < 3 cm in maximaler Ausdehnung, umgeben von Lungengewebe oder Pleura visceralis, kein bronchoskopischer Nachweis eines invasiven Wachstums proximal der Lappenbronchien T1a: Tumorstadiumgröße < 2 cm T1b: Tumorstadiumgröße > 2 cm und < 3 cm
T2	Tumorstadiumgröße > 3 cm und < 7 cm in maximaler Ausdehnung oder Aufweisen eines der folgenden Merkmale: Beteiligung des Hauptbronchus > 2 cm distal der Carina tracheae, Invasion der Pleura visceralis, partielle Atelektase T2a: Tumorstadiumgröße > 3 cm und < 5 cm T2b: Tumorstadiumgröße > 5 cm und < 7 cm
T3	Tumorstadiumgröße > 7 cm oder Invasion von Brustwand, Zwerchfell, Nervus phrenicus, Pleura mediastinalis, Lamina parietalis pericardii oder Aufweisen eines der folgenden Merkmale: Beteiligung des Hauptbronchus < 2 cm distal der Carina tracheae, totale Atelektase, separate Tumorstadiumherde innerhalb desselben Lungenlappens
T4	Tumorstadium jeglicher Größe mit Invasion von Mediastinum, Herz, großen Gefäßen, Nervus laryngeus recurrens, Ösophagus, Wirbelkörpern oder Carina tracheae oder separate Tumorstadiumherde innerhalb eines anderen ipsilateralen Lungenlappens

Die Beschreibung der Ausbreitung von Tumorzellen in regionale Lymphknoten erfolgt mittels N-Staging und umfasst das Fehlen von Lymphknotenmetastasen (N0), den ipsilateralen Befall peribronchialer oder hilärer Lymphknoten (N1), mediastinaler oder

subkarinaler Lymphknoten (N2) sowie Lymphknotenmetastasen, die im kontralateralen Mediastinum oder im Hilum, in den ipsilateralen oder den kontralateralen Musculi scaleni oder supraklavikulär auftreten (N3). Gelegentlich fehlt die Beurteilung des Lymphknotenbefalls (Nx). Das M-Staging bewertet das Vorhandensein von Metastasen mit der Ausnahme regionaler Lymphknotenmetastasen. Hierbei werden das Fehlen von Metastasen (M0), das Auftreten von separaten Tumoren im kontralateralen Lungenflügel beziehungsweise maligne Pleuraergüsse oder Perikardergüsse (M1a) und schließlich das Vorliegen von Fernmetastasen (M1b) unterschieden. Unter Umständen ist der Nachweis von Metastasen nicht möglich (Mx).

Tabelle 2: Krankheitsstadien des Bronchialkarzinoms entsprechend der TNM-Klassifikation

Stadieneinteilung			
Okkultes Karzinom	Tx	N0	M0
Stadium 0	TIS	N0	M0
Stadium IA	T1a, T1b	N0	M0
Stadium IB	T2a	N0	M0
Stadium IIA	T2b	N0	M0
	T1a, T1b, T2a	N1	M0
Stadium IIB	T2b	N1	M0
	T3	N0	M0
Stadium IIIA	T1a, T1b, T2a, T2b	N2	M0
	T3	N1, N2	M0
	T4	N0, N1	M0
Stadium IIIB	T4	N2	M0
	Jedes T	N3	M0
Stadium IV	Jedes T	Jedes N	M1

Abkürzungen: TIS - Carcinoma in situ, Tumor in situ

Aus der TNM-Klassifikation ergibt sich die Einteilung des Bronchialkarzinoms in verschiedene Krankheitsstadien (siehe Tabelle 2). Vom Krankheitsstadium abhängig sind die Auswahl geeigneter Therapieoptionen sowie die Einschätzung der individuellen Prognose (Mirsadraee et al. 2012). Trotz der Anwendbarkeit des TNM-Systems auf nichtkleinzellige und kleinzellige Bronchialkarzinome wird bei letzterem ebenso zwischen „very limited disease“, „limited disease“ und „extensive disease“ unterschieden. Diese vereinfachte Klassifizierung ermöglicht primär eine Einschätzung des Krankheitsstadiums je nach Durchführbarkeit einer Bestrahlungstherapie (Goeckenjan et al. 2011).

2.1.1 Kleinzelliges Bronchialkarzinom

Das kleinzellige Bronchialkarzinom stellt mit einem Anteil von 15 % einen Subtypen des Bronchialkarzinoms dar, der sich histologisch durch im Vergleich zu gesunden Normalgewebszellen kleine Tumorzellen auszeichnet. Neben der verringerten Zellgröße weisen die Tumorzellen auch einen vergleichsweise geringeren DNA-Gehalt im hypoploiden Bereich sowie kleinere Zellkerne auf (Herold 2015, Petersen 2010). Bevorzugte Manifestationsorte liegen im Bereich zentraler und intermediärer Bronchien beziehungsweise Bronchiolen, häufig verbunden mit einem manschettentförmigen Tumorwachstum (Junker und Petersen 2008). Histologisch zeichnen sich kleinzellige Bronchialkarzinome aufgrund einer hohen Proliferationsaktivität, einhergehend mit einer hohen Mitoserate, durch ein ungeordnetes Wachstumsmuster runder, ovaler oder spindelförmiger Zellen mit hyperchromatischen Zellkernen und zahlreichen Mitosefiguren aus. Weitere morphologische Merkmale sind unscharfe Zellgrenzen, ein schmaler Zytoplasmasaum, eine feingranuläre Chromatinstruktur und das Fehlen prominenter Nukleolen (Junker und Petersen 2008). Da die Tumorzellen in ihrem Aussehen Haferkörnern ähneln, wird das kleinzellige Bronchialkarzinom mitunter auch als Haferzellkarzinom (englisch: oat cell carcinoma) bezeichnet.

Aufgrund seiner schlechten Differenzierung gilt das kleinzellige Bronchialkarzinom als hoch maligne und prognostisch ungünstig. Zum Zeitpunkt der Diagnose ist bereits zu etwa 80 % eine Metastasierung nachzuweisen (Herold 2015). Prädilektionsstellen von Fernmetastasen sind hierbei insbesondere Gehirn, Leber, Knochenmark und Nebennieren. Da die Tumoren höchstwahrscheinlich von neuroendokrinen Zellen der Lunge ausgehen, treten klinisch häufig paraneoplastische Syndrome auf, wie beispielsweise paraneoplastische Endokrinopathien durch eine ektope Hormonausschüttung der Tumorzellen (Junker und Petersen 2008).

2.1.2 Nichtkleinzelliges Bronchialkarzinom

Das nichtkleinzellige Bronchialkarzinom stellt mit einem Anteil von 85 % einen weiteren Subtypen des Bronchialkarzinoms dar und umfasst alle Tumorentitäten, die nicht dem kleinzelligen Bronchialkarzinom zuzuordnen sind. Hierzu zählen unter anderem das Plattenepithelkarzinom (40 %), das Adenokarzinom (35 %) und das großzellige Lungenkarzinom (10 %). Entsprechend der Zellgröße weisen die Tumorzellen durch einen erhöhten DNA-Gehalt im nahezu triploiden Bereich vergrößerte Zellkerne auf (Herold 2015, Petersen 2010). Bevorzugte Manifestationsorte sind in Abgrenzung zum

kleinzelligen Bronchialkarzinom vor allem peripher gelegene Lungenabschnitte mit der Ausnahme vorwiegend zentral lokalisierter Plattenepithelkarzinome.

Das Plattenepithelkarzinom ist definiert als ein maligner epithelialer Tumor mit Verhornungszeichen und vom Bronchialepithel ausgehenden Zellfortsätzen zwischen den Tumorzellen, die als Interzellularbrücken bezeichnet werden. Diese Merkmale variieren in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad und sind in schlecht differenzierten Tumoren lediglich fokal ausgeprägt. Die Tumorzellen sind üblicherweise isoliert, können vereinzelt aber auch als zusammenhängende Aggregate erscheinen. Häufig bilden Zellablagerungen und nekrotische Areale die unmittelbare Tumorzellumgebung. Histologisch zeigen sich zentral gelegene, hyperchromatische Zellkerne, markante Nukleolen und reichlich Zytoplasma (Hammar et al. 2004).

Als Adenokarzinom wird ein maligner epithelialer Tumor mit einer glandulären Differenzierung oder einer Muzinproduktion bezeichnet. Es werden azinäre, papilläre, bronchoalveoläre und solide Wachstumsmuster unterschieden, die von prognostischer Bedeutung sind. Häufig ist hierbei das Auftreten von heterogenen Mischformen (Petersen und Warth 2014). Die Tumorzellen weisen glatt konturierte Zellkerne mit einer feingranulierten Chromatinstruktur und prominenten Nukleolen auf. Das Zytoplasma zeigt sich in den meisten Zellen deutlich homogen oder granulär, kann aber aufgrund kleiner unscharf begrenzter Vakuolen auch ein schaumiges Aussehen annehmen. Mitunter bilden sich so genannte Siegelringzellen, die durch das Vorliegen einer großen Vakuole einen randständigen Zellkern erkennen lassen (Colby et al. 2004, Petersen und Warth 2014).

Fehlen sowohl zytologische oder architektonische Merkmale eines kleinzelligen Bronchialkarzinoms als auch eine Differenzierung gemäß eines Plattenepithelkarzinoms oder eines Adenokarzinoms, handelt es sich um ein entdifferenziertes großzelliges Bronchialkarzinom. Morphologisch zeigen großzellige Bronchialkarzinome Ansammlungen großer polygonaler Tumorzellen. Histologisch weisen sie bis auf das gehäufte Vorliegen von Zellaggregaten, unscharfen Tumorzellbegrenzungen und prominenten Nukleolen keine spezifischen Merkmale auf (Brambilla et al. 2004). Die Diagnose beruht daher zumeist auf dem Ausschluss anderer histologischer Subtypen.

2.1.3 Ätiologie und Pathogenese

Ätiologisch bedeutsam bezüglich der Lungenkrebsentstehung sind unter anderem die aktive oder passive Inhalation von Zigarettenrauch, die Exposition mit Radon sowie radioaktiver Strahlung, die berufliche oder umweltbedingte Gefährdung durch Kanzerogene wie Asbest, Chrom-Verbindungen, Arsen, Feinstaub oder polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe sowie die genetische Disposition (Goeckenjan et al. 2011). Das gleichzeitige Vorliegen mehrerer Risikofaktoren potenziert das Gesamtrisiko zur Entstehung eines Bronchialkarzinoms.

Tabakrauchen gilt als Hauptrisikofaktor in der Entwicklung maligner Lungentumoren. Die Inhalation von Zigarettenrauch ist mit der Entstehung von 85 % aller Bronchialkarzinome assoziiert (Herold 2015). Prädisponierend sind insbesondere die Dauer des Rauchens, ein frühzeitiger Rauchbeginn und die Anzahl gerauchter Zigaretten, die durch so genannte Packungsjahre, als Produkt täglich gerauchter Zigarettenpackungen und der Anzahl an Raucherjahren, beschrieben werden. Durch die Exposition mit Tabakrauch besteht ein erhöhtes Risiko für sämtliche histologische Zelltypen. Auch die Herstellung von Zigaretten mit einem niedrigeren Teer-, Nikotin- und Kohlenmonoxidgehalt hat gegenwärtig nicht zu einer Verringerung des Erkrankungsrisikos geführt (Goeckenjan et al. 2011). Dagegen wurde eine erhöhte Konzentration kanzerogener wirkender Nitrosamine in diesen Zigaretten nachgewiesen (Ridge et al. 2013). Gemäß einer europäischen Studie, die den Zusammenhang zwischen Tabakrauchen und Bronchialkarzinomen untersuchte, haben männliche Raucher im Vergleich zu Nichtrauchern ein 24-fach höheres und ehemalige männliche Raucher ein 7,5-fach erhöhtes Erkrankungsrisiko. Dem entsprechend haben weibliche Raucher ein 8,7-fach erhöhtes Risiko und ehemalige Raucherinnen ein etwa doppelt so hohes Risiko, maligne Lungentumoren auszubilden (Simonato et al. 2001).

Neben der Tabakrauchinhalation ist die Radon-Exposition als natürliche Strahlenbelastung ebenfalls ein bedeutender Risikofaktor. Radon entsteht aus dem Zerfall langlebiger Uran- und Thoriumnuklide, die in Böden und Gesteinen vorkommen (Goeckenjan et al. 2011). Als radioaktives Edelgas verlässt Radon die tiefen Gesteinsschichten und diffundiert aus dem Boden. Hohe Konzentrationen bilden sich dadurch in geschlossenen, bodennahen Räumen in Kellern und Erdgeschossen, wohingegen die Konzentration in der Außenluft vergleichsweise niedrig ist. Durch die Inhalation von

Radon ist vor allem das Epithel von Bronchien und Bronchiolen exponiert. Karzinogene Effekte entstehen durch die Wechselwirkung des Epithels mit Radon-Zerfallsprodukten sowie dabei emittierter Alphastrahlung.

Die Pathogenese des Bronchialkarzinoms wird durch ein Mehrstufenkonzept erklärt. Zu Beginn erfolgt im Sinne einer Initiation die Exposition mit Karzinogenen und Stoffen, die zu einer Schädigung der DNA führen. Entzündliche Prozesse, auf die das exponierte Bronchialepithel mit einer Hyperplasie der Basalzellen und einer gesteigerten Mitoseaktivität reagiert, können die Proliferation der auf diese Weise initiierten Zellen bedingen (Parzefall und Schulte-Hermann 2010). Präkanzerosen manifestieren sich durch eine ununterbrochene Zellteilung mit einer zunehmenden Entdifferenzierung und Entstehung von Dysplasien und Zellatypien. Zudem weisen sie Veränderungen der Zellmorphologie und genetische Aberrationen auf. Bedeutend in der Karzinogenese sind ebenfalls Mutationen des p53-Gens, die Zellzyklusdysregulationen bedingen (Ewig et al. 2014, Parzefall und Schulte-Hermann 2010, Ridge et al. 2013). Zwischen der Exposition mit den entsprechenden Karzinogenen, der resultierenden Entstehung von Präkanzerosen und schließlich Tumoren können viele Jahre oder sogar Jahrzehnte liegen.

2.1.4 Klinik, Diagnostik und Therapie

Die klinische Manifestation eines Bronchialkarzinoms variiert in Abhängigkeit vom Tumorstadium und dem Fortschreiten der Erkrankung, wobei das Fehlen charakteristischer Frühsymptome oftmals eine frühzeitige Diagnostik sowie eine rechtzeitige Intervention erschwert. Häufig sind Symptome einer fortgeschrittenen Tumorerkrankung Gründe zur Erstvorstellung betroffener Patienten. Insgesamt werden Symptome unterschieden, die sich durch den Primärtumor, eine intrathorakale oder extrathorakale Metastasierung beziehungsweise eine sich systemisch manifestierende Tumorerkrankung äußern. Weiterhin ist das Auftreten paraneoplastischer Syndrome in diesem Zusammenhang von großer klinischer Relevanz (Goeckenjan et al. 2011).

Abhängig von der Lokalisation des Primärtumors sind die zuerst auftretenden unspezifischen Symptome oftmals Husten oder eine Veränderung dessen Charakters, thorakale Missempfindungen und Brustschmerzen (Prasse et al. 2010). Das Abhusten von blutigem Sekret gilt bereits als Spätsymptom. Ein intrathorakales Tumorwachstum, einhergehend mit der Schädigung von Nervenstrukturen, Gefäßen oder benachbarten

Organen und Geweben, kann vielseitige Erkrankungszeichen bedingen. Häufig sind hierbei eine Heiserkeit durch die Schädigung des Nervus laryngeus recurrens, Empfindungsstörungen und neurologische Ausfälle bei einer Infiltration des zervikalen Nervenplexus sowie die Ausprägung eines Horner-Syndroms mit Miosis, Ptosis und Enophthalmus bei Schädigung des zervikal gelegenen Ganglion stellatum. Aber auch Zeichen einer oberen Einflusstauung durch Kompression der Vena cava superior sind mögliche Symptome. Bei einer extrathorakalen Tumorausbreitung im Rahmen der Metastasierung sind unter anderem Organe wie Gehirn, Leber, Knochenmark und Nebennieren betroffen und die klinische Erscheinung variiert entsprechend den betroffenen Strukturen (Goeckenjan et al. 2011, Herold 2015). Die sich systemisch äußernden Begleitsymptome sind eher unspezifisch und umfassen einen ungewollten Gewichtsverlust, Schwäche bis zu Müdigkeit und Erschöpfung sowie Schmerzen. Symptome, die mit einer Tumorerkrankung assoziiert, allerdings nicht unmittelbar durch diese bedingt sind, werden als paraneoplastisches Syndrom zusammengefasst. Sie treten insbesondere beim kleinzelligen Bronchialkarzinom auf. Hierbei werden paraneoplastische Endokrinopathien, Neuropathien und Myopathien sowie allgemeine paraneoplastische Symptome, wie beispielsweise eine Anämie oder eine Thrombozytose, unterschieden (Herold 2015).

In der Diagnostik von Lungentumoren werden neben basisdiagnostischen und bildgebenden Methoden auch mikroskopische Untersuchungsverfahren angewendet. Aufgrund unterschiedlicher therapeutischer Maßnahmen ist die Beurteilung des histologischen Subtyps von besonderer Relevanz. Hierbei gilt es, nichtkleinzellige und kleinzellige Bronchialkarzinome sowohl voneinander, als auch gegenüber benignen Lungentumoren oder Lungenmetastasen abzugrenzen. Die Intensität der durchgeführten Diagnostik ist dabei abhängig vom Allgemeinbefinden des Patienten und dessen individueller Prognose (Prasse et al. 2010).

Die Basisdiagnostik beinhaltet die ausführliche Anamneseerhebung und körperliche wie labordiagnostische Untersuchungen. Anamnestisch ist das Erfragen der Familienanamnese, bestehender Vorerkrankungen, der Rauchgewohnheiten sowie einer potentiellen beruflichen Exposition mit kanzerogenen Stoffen relevant. In der Labor-diagnostik werden insbesondere Blutbild und Differentialblutbild, Elektrolyte sowie Leberwerte, Nierenwerte und Gerinnungswerte bestimmt. Die routinemäßige Erfassung von Tumormarkern ist wegen einer geringen Spezifität und einer geringen Sen-

sitivität allerdings nicht empfehlenswert (Goeckenjan et al. 2011). Bildgebende Verfahren werden zur präzisen Lokalisation des Tumors, zum Ausschluss oder zum Nachweis von Lymphknotenmetastasen oder Fernmetastasen und zur Bestimmung des Tumorstadiums entsprechend der TNM-Klassifikation angewendet. Hierzu zählen Röntgenaufnahmen des Brustkorbes in zwei Ebenen, eine kontrastmittelverstärkte Computertomografie des Brustkorbes und der Oberbauchregion sowie eine kontrastmittelverstärkte Magnetresonanztomografie, die wegen des hohen Weichteilkontrasts eine gute Differenzierung von Tumorgewebe und Nichttumorgewebe ermöglicht. Auch der Einsatz nuklearmedizinischer Untersuchungsverfahren zur Darstellung von Stoffwechselprozessen, beispielsweise des Glukosestoffwechsels mithilfe der Positronenemissionstomografie mit ^{18}F -Fluordesoxyglukose, dient der Unterscheidung von Tumorgewebe und Nichttumorgewebe (Goeckenjan et al. 2011, Herold 2015).

Nach dem Auffinden lungentumorverdächtiger Areale ist die histologische Beurteilung mittels mikroskopischer Untersuchungsverfahren notwendig. Hierbei kommen endoskopische Techniken, wie die Bronchoskopie, die Thorakoskopie oder die Mediastinoskopie zum Einsatz, die auch der Entnahme von Gewebeproben dienen. Die wichtigste dieser Methoden, insbesondere bei zentral gelegenen Lungentumoren, ist die Bronchoskopie, die darüber hinaus mit einem endobronchialen Ultraschall zur präzisen Biopsie von Tumorgewebe oder Lymphknotengewebe kombiniert werden kann und die Durchführung einer bronchoalveolären Lavage ermöglicht (Prasse et al. 2010).

Die Behandlungsmöglichkeiten des Bronchialkarzinoms umfassen einerseits die operative Tumorentfernung, chemotherapeutische und radiotherapeutische Verfahren sowie andererseits zielgerichtete rezeptor- und ligandenspezifische Methoden. Die aktuelle Leitlinie zur Therapie nichtkleinzelliger und kleinzelliger Bronchialkarzinome stammt von der „Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin“ und der „Deutschen Krebsgesellschaft“ aus dem Jahr 2010 und befindet sich aktuell in Überarbeitung (Goeckenjan et al. 2011). Die Auswahl der geeigneten Behandlungsstrategien ist dabei unter anderem von der Tumorentität und dem Erkrankungsstadium nach der TNM-Klassifikation abhängig.

Nichtkleinzellige Bronchialkarzinome, die in den Erkrankungsstadien I, II oder IIIA diagnostiziert werden, erfordern primär eine operative Tumoresektion durch die Entfernung des betroffenen Lungenlappens (Lobektomie) beziehungsweise bei ausgedehnten, parenchymüberschreitenden Tumorbefunden die Entfernung von zwei

Lungenlappen (Bilobektomie) oder des kompletten Lungenflügels (Pneumektomie) (Prasse et al. 2010). Bei kleineren Lungentumoren kann ebenso lediglich die Entfernung des betroffenen anatomischen Lungensegmentes erwogen werden, wobei die Gefahr einer inkompletten Tumorresektion mit Notwendigkeit einer Nachresektion besteht. Um das Risiko eines Tumorrezidivs zu senken und eventuell vorhandene Mikrometastasen zu behandeln, wird in den Erkrankungsstadien II und IIIA zusätzlich eine adjuvante chemotherapeutische Behandlung empfohlen (Goeckenjan et al. 2011). Patienten, die aufgrund einer eingeschränkten Lungenfunktion, eines hohen Lebensalters oder bestehender Komorbiditäten initial nicht operiert werden können, profitieren von einer primären Radiotherapie. Fortgeschrittene nichtkleinzellige Bronchialkarzinome in den Erkrankungsstadien IIIB oder IV bedürfen eines interdisziplinären, multimodalen Behandlungskonzeptes. Abhängig vom Allgemeinzustand des Patienten erfolgt eine chemotherapeutische Behandlung als Monotherapie oder als Kombinationstherapie. Radiotherapeutische Verfahren und operative Behandlungsmöglichkeiten, wie beispielsweise die Entfernung singulärer Hirnmetastasen, dienen der Verbesserung der Lebensqualität und der Symptomkontrolle.

Die Therapie kleinzelliger Bronchialkarzinome beinhaltet unabhängig vom Stadium der Erkrankung eine kombinationschemotherapeutische Behandlung. Entsprechend dem Erkrankungsstadium wird zusätzlich die Durchführung einer operativen Therapie oder einer Radiotherapie erwogen, die jedoch als alleinige Methoden keine Therapieoptionen darstellen (Goeckenjan et al. 2011). Bei auf das Lungengewebe beschränkten kleinzelligen Bronchialkarzinomen ohne den Nachweis einer Tumorausbreitung in mediastinale Lymphknoten („very limited disease“) kann eine operative Tumorentfernung mit anschließender Chemotherapie angestrebt werden. Im Stadium „limited disease“ wird bei einer bestrahlungsfähigen Tumorausdehnung eine Radiochemotherapie empfohlen. Die Durchführung einer prophylaktischen Schädelbestrahlung zur Reduzierung des Auftretens möglicher Hirnmetastasen sollte sowohl im Stadium „very limited disease“, als auch im Stadium „limited disease“ erwogen werden. Ein fernmetastasiertes kleinzelliges Bronchialkarzinom im fortgeschrittenen Erkrankungsstadium „extensive disease“ erfordert in Abhängigkeit vom Allgemeinzustand des Patienten ein multimodales Vorgehen. Neben der chemotherapeutischen Behandlung sind die Radiotherapie möglicher Hirnmetastasen beziehungsweise eine prophylaktische Schädelbestrahlung sowie symptomorientierte Maßnahmen von Bedeutung.

2.2 Chemokine und Chemokinrezeptoren

Chemokine bezeichnen eine Gruppe kleiner Signalproteine (8-15 kDa), die der Familie der Zytokine zuzuordnen sind. Aus der ursprünglich nachgewiesenen Funktion, für die Chemotaxis von Granulozyten und Monozyten verantwortlich zu sein, ergibt sich die Bezeichnung „Chemokin“ als Kurzform für „chemotaktisches Zytokin“.

Die Struktur der Chemokine ist durch die Wechselwirkung von Cysteinen definiert. Entsprechend der Lage der ersten zwei im N-terminalen Bereich liegenden Cysteine erfolgt die Einteilung in C-, CC-, CXC- und CX₃C-Chemokine. Diese Nomenklatur ist von der Einbuchstaben-Abkürzung C für die Aminosäure Cystein und der Anzahl der zwischen den Cysteinen liegenden Nicht-Cystein-Aminosäuren X abgeleitet (Loppnow 2001). Zwischen den Cysteinen werden Disulfidbrücken ausgebildet, die die Tertiärstruktur der Chemokine stabilisieren. Üblicherweise bilden Chemokine zwei Disulfidbrücken aus, wobei Ausnahmen bestehen. Trotz einer hohen Variabilität in den Aminosäuresequenzen verschiedener Chemokine, weisen die Tertiärstrukturen deutliche Ähnlichkeiten auf. Diese besteht gewöhnlich aus einem freien N-Terminus, einem dreisträngigen β -Faltblatt und einer C-terminalen α -Helix (Allen et al. 2007).

Chemokinrezeptoren sind ausnahmslos G-Protein-gekoppelte Rezeptoren mit sieben membrandurchspannenden Helices, die durch außerhalb der Zellmembran liegende Schleifen („loops“) miteinander verbunden sind. Der N-Terminus des Rezeptors sowie drei Schleifen liegen extrazellulär, der C-Terminus und drei weitere Schleifen befinden sich intrazellulär (Allen et al. 2007). Gemäß der Einteilung der Chemokine erfolgt hierbei die Differenzierung in XC-, CC-, CXC- und CX₃C-Chemokinrezeptoren. Aktuell werden ungefähr 50 Chemokine und etwa 20 Chemokinrezeptoren unterschieden. Dies impliziert, dass viele Chemokine in der Lage sind, an mehrere Chemokinrezeptoren zu binden.

Bedeutsam für die Bindung zwischen Chemokin und entsprechenden Chemokinrezeptoren sind deren N-terminalen Bereiche. Der N-Terminus von Chemokinen induziert die Signaltransduktionsmechanismen und ist dementsprechend von besonderer Relevanz bei der physiologischen Regulation der Chemokinaktivität, indem Proteasen zur Abspaltung des N-terminalen Endes imstande sind. Die entstandenen Spaltprodukte unterscheiden sich von den unveränderten Chemokinen bezüglich der Affinität und der Spezifität der Rezeptorbindung (Allen et al. 2007).

Die Hauptwirkungen der Chemokine umfassen unter anderem die gerichtete Migration von Immunzellen zur höchsten Chemokin-Konzentration entlang des Konzentrationsgradienten sowie eine Beteiligung an der Embryogenese, Organogenese, Angiogenese und auch Angiostase (Allen et al. 2007, Fernandez und Lolis 2002). Chemokinrezeptoren und Chemokine werden von sehr unterschiedlichen Zellen exprimiert, wobei insbesondere Leukozytenpopulationen wie Monozyten, B-Lymphozyten und T-Lymphozyten, Granulozyten, dendritische Zellen und natürliche Killerzellen (NK-Zellen) zu erwähnen sind (Loppnow 2001).

Entsprechend ihrer Funktion kann die Einteilung in homöostatisch und inflammatorisch wirkende Chemokine erfolgen. Homöostatische Chemokine werden in bestimmten Geweben grundsätzlich exprimiert und sind bedeutend für die Entwicklung und Aufrechterhaltung der Hämatopoese und des Immunsystems. Die Expression inflammatorischer Chemokine durch kreisende Leukozyten ist hingegen lediglich durch entzündliche Stimuli induzierbar und findet nicht generell statt (Vandercappellen et al. 2008). Als Antwort auf Gewebeschäden oder Infektionen bedingen diese inflammatorischen Chemokine die Chemotaxis von Immunzellen zum Zielort und die Wahrung dieses Effekts bis zum Abklingen des entzündlichen Prozesses (Allen et al. 2007).

2.2.1 CXCR4/CXCL12-Achse

Die Wechselwirkung des CXC-Chemokins CXCL12, ebenfalls bekannt unter der Bezeichnung SDF-1 (englisch: Stromal Cell-Derived Factor 1), mit dem Chemokinrezeptor CXCR4 ist für eine Vielzahl an physiologischen Funktionen unentbehrlich. So konnte die Beteiligung der CXCR4/CXCL12-Interaktion an der gerichteten Migration von Stammzellen und Immunzellen sowie an der Hämatopoese, der Organogenese des neuronalen und kardialen Systems, der Angiogenese und der Vaskularisation nachgewiesen werden (Chatterjee et al. 2014, Furusato et al. 2010, Vandercappellen et al. 2008). Während der Ontogenese ist insbesondere die Besiedlung des Knochenmarks durch hämatopoetische Stammzellen, die Ausbildung des membranösen Anteils des Ventrikelseptums sowie die Vaskularisation des Verdauungstrakts, der Haut und der Niere auf die Wirkung der CXCR4/CXCL12-Achse zurückzuführen (Nagasawa 2014). Durch die gezielte genetische Deaktivierung des CXCR4 oder des CXCL12/SDF-1 in Knock-out-Mäusen, welche mit einer Verschlechterung der Hämatopoese und der Vaskularisation sowie Defekten bei der Entwicklung von Herz und Gehirn einherging, gelang der Nachweis dieser charakteristischen CXCR4/

CXCL12-vermittelten Funktionen. Die genetische Deaktivierung sowohl des CXCR4, als auch des CXCL12 war in den durchgeführten Versuchen mit Knockout-Mäusen nicht mit dem Leben vereinbar und führte zu einer embryonalen Letalität (Furusato et al. 2010, Teicher und Fricker 2010).

Der Chemokinrezeptor CXCR4 wird von einer Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen und Gewebetypen exprimiert, wie hämatopoetischen Stammzellen in Blut und Knochenmark, Makrophagen, Monozyten, B- und T-Lymphozyten, neutrophilen Granulozyten und dendritischen Zellen. Ebenso ist er auf der Zelloberfläche von Astrozyten, der Mikroglia sowie endothelialen und epithelialen Zellen nachweisbar (Chatterjee et al. 2014, Teicher und Fricker 2010). Knochenmark, Blut und Lymphknoten sind hierbei die Gewebe mit den höchsten CXCR4-Konzentrationen (Furusato et al. 2010). Aufgrund der chemotaktischen Funktion des CXCR4 migrieren CXCR4-exprimierende Zellen entlang des Gradienten zur höchsten CXCL12/SDF-1-Konzentration.

Die Struktur von CXCR4 als heptahelikaler G-Protein-gekoppelter Rezeptor entspricht der Struktur von anderen bekannten Chemokinrezeptoren. Zwei extrazellulär gelegene Disulfidbrücken stabilisieren darüber hinaus die Bindungstasche für den endogenen CXCR4-Liganden CXCL12/SDF-1 und sind daher von funktioneller Relevanz für die CXCR4/CXCL12-Interaktion und die CXCR4-Aktivierung (Wu et al. 2010).

Nach aktuellen Erkenntnissen ist CXCL12/SDF-1 der einzige bekannte endogene Ligand für den Chemokinrezeptor CXCR4 und ist darüber hinaus auch der Bindung an den Chemokinrezeptor CXCR7 fähig. Als homöostatisches Chemokin erfolgt die Expression und Sezernierung von CXCL12/SDF-1 konstitutiv und, wie auch beim Chemokinrezeptor CXCR4, durch sehr unterschiedliche Zelltypen und Gewebetypen. Leber, Lunge, Nieren, Gehirn und Knochenmark sind hierbei die Gewebe mit den höchsten Konzentrationen dieses Chemokins (Chatterjee et al. 2014). Man unterscheidet sechs Isoformen von CXCL12/SDF-1, die durch alternatives Spleißen entstehen und als SDF-1 α , SDF-1 β , SDF-1 γ , SDF-1 δ , SDF-1 ϵ und SDF-1 ϕ bezeichnet werden (Yu et al. 2006). Den Isoformen gemeinsam ist eine als Signalsequenz fungierende Sequenz von 21 Aminosäuren (Nagasawa 2014).

Wie auch bei anderen Chemokinen kann die Wirkung von CXCL12/SDF-1 durch Proteasen, beispielsweise die Dipeptidylpeptidase-4, mittels N-terminaler Prozessierung reguliert werden. Diese Veränderung des N-Terminus bedingt dabei vor allem

eine Verschlechterung der angiogenen Wirkung (Vandercappellen et al. 2008). Weitere Regulationsmechanismen der CXCR4/CXCL12-Achse umfassen die gesteigerte Expression sowohl von CXCR4, als auch von CXCL12/SDF-1 unter potentiell gewebezerstörenden Bedingungen, etwa bei Hypoxie oder bei Strahlenexposition (Teicher und Fricker 2010).

2.2.2 Signaltransduktion des CXCR4

Die Aktivierung des Chemokinrezeptors CXCR4 durch dessen Liganden CXCL12/SDF-1 führt zur Induktion einer Vielzahl von intrazellulären Signaltransduktionsprozessen. Infolge dieser Mechanismen entwickeln sich unter anderem ein Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration, eine Zunahme der Gentranskription sowie eine Verbesserung der Zellmigration, des Zellüberlebens und der Proliferation (Chatterjee et al. 2014). Insbesondere für CXCR4-exprimierende Tumorzellen ist dies hinsichtlich der Metastasierung, der Invasivität und des Tumorwachstums von großer Bedeutung. Wie alle bisher bekannten Chemokinrezeptoren ist auch der CXCR4 ein G-Proteingekoppelter Rezeptor, der darüber hinaus der Subgruppe der G_i -gekoppelten Rezeptoren zuzuordnen ist.

Die Bindung des CXCR4-Liganden CXCL12/SDF-1 am extrazellulären Anteil des Chemokinrezeptors bewirkt die Aktivierung des heterotrimeren, aus einer $G\alpha$ -, $G\beta$ - und $G\gamma$ -Untereinheit bestehenden G-Proteins. Der Austausch des an der $G\alpha$ -Untereinheit im inaktiven Zustand gebundenen Guanosindiphosphats (GDP) durch Guanosintriphosphat (GTP) bedingt aufgrund der dadurch entstehenden Instabilität des G-Protein-Komplexes dessen Zerfall in eine $G\alpha$ - und eine $G\beta\gamma$ -Untereinheit, die den Ablauf weiterer Signaltransduktionsprozesse ermöglichen. Neben dieser G-Protein-abhängigen Signaltransduktion besteht mittels Homodimerisierung von CXCR4 und der damit verbundenen Aktivierung des JAK/STAT-Signalweges (Januskinase; englisch: Signal Transducer and Activator of Transcription) ebenfalls ein G-Protein-unabhängiger Mechanismus zur Vermittlung der CXCR4/CXCL12-Funktionen (Chatterjee et al. 2014, Mellado et al. 2001).

Durch die $G\beta\gamma$ -vermittelte Aktivierung der zellmembranständigen Phospholipase C erfolgt die Bildung der sekundären Botenstoffe Inositoltrisphosphat (IP_3) und Diacylglycerin (DAG) aus dem Phospholipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2). IP_3 führt durch Bindung an spezifische Rezeptoren des endoplasmatischen

Retikulums zu einer Freisetzung von Kalziumionen ins Zytoplasma entsprechend dem Konzentrationsgradienten. Die Interaktion der freigesetzten Kalziumionen mit DAG veranlasst schließlich die Aktivierung der Proteinkinase C, die wiederum die Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kaskade (MAPK) initiiert. Diesem Signalweg wird eine hohe Bedeutung für die Zellmigration mittels Regulation cytoskelettaler Veränderungen beigemessen (Mellado et al. 2001). Auch die Wirkung der G $\beta\gamma$ -aktivierten Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) wird für die Induktion von Zellmigrationsprozessen verantwortlich gemacht. Die Phosphorylierung einer Vielzahl für die fokale Adhäsion der Zelle zuständigen Komponenten bewirkt cytoskelettale Veränderungen im Rahmen einer Neuorganisation des Aktin-Cytoskeletts (Chatterjee et al. 2014).

Weiterhin ermöglicht die PI3K die Induktion des PI3K/Akt-Signalweges durch die Bildung von Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃) infolge der Phosphorylierung von PIP₂. Akt entspricht hierbei der Serin/Threonin-Kinase Proteinkinase B (PKB). Die Wechselwirkung von Akt/PKB mit PIP₃ veranlasst die Phosphorylierung des proapoptotisch wirkenden BAD (englisch: Bcl-2-Associated Death Promoter) aus der Familie der Bcl-2-Proteine (englisch: B-cell lymphoma 2). BAD inhibiert im nicht-phosphorylierten Zustand durch Bindung an Bcl-2 dessen antiapoptotische Wirkung, wodurch das Zellüberleben reguliert wird (Song et al. 2005). Neben der BAD-vermittelten Inhibition der Apoptose besteht eine Vielzahl weiterer Mechanismen, die durch die Wirkung von Akt/PKB das Zellüberleben beeinflussen. Der PI3K/Akt-Signalweg ist ebenso an der Steuerung von Zellwachstum und Proliferation beteiligt. Durch die Regulation des Proteinkomplexes mTORC1 (englisch: mammalian Target of Rapamycin Complex 1), der bedeutend für die Kontrolle des Zellwachstums ist, werden eine Zunahme der Zellmasse und eine Steigerung der Proteinsynthese erreicht. Die Proliferation wird mithilfe der Akt/PKB-induzierten Phosphorylierung entsprechender Zellzyklus-Komponenten reguliert (Manning und Cantley 2007).

Die G α -Untereinheit des G-Protein-Komplexes ist neben der Aktivierung des MAPK-Signalweges ebenfalls zur Initiierung des PI3K/Akt-Signalweges imstande. Über diese Mechanismen werden die direkte und die indirekte Aktivierung von NF- κ B (englisch: Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells) vermittelt, der als Transkriptionsfaktor eine Veränderung der Genexpression sowie eine Steigerung der Gentranskription induziert (Chatterjee et al. 2014). Die Transkription NF- κ B-abhängiger Gene begünstigt insbesondere das Zellüberleben (Song et al. 2005).

2.2.3 CXCR4-Expression auf Tumorzellen

Die tumorspezifische Expression des Chemokinrezeptors CXCR4 ist in einer Vielzahl verschiedener Tumorentitäten nachgewiesen worden. Die Detektion CXCR4-exprimierender Tumorzellen gelang bisher in mehr als 20 Tumorentitäten, unter anderem der Lunge, der Niere und des Gehirns (Chatterjee et al. 2014). Den physiologischen Funktionen der CXCR4/CXCL12-Achse entsprechend, wie der gerichteten Migration CXCR4-positiver Zellen, der Beteiligung an der Angiogenese und der Vaskularisation sowie am Zellüberleben und an der Proliferation, wird der tumorspezifischen CXCR4-Expression die Mitwirkung an Tumorwachstum, Invasivität, Metastasierung und Chemotherapieresistenz zugeschrieben (Chatterjee et al. 2014, Furusato et al. 2010, Nagasawa 2014). Begünstigt wird die Expression von CXCR4 hierbei vor allem durch den Hypoxie-induzierten Faktor HIF-1 α und die Wachstumsfaktoren EGF (englisch: Epidermal Growth Factor) und VEGF (englisch: Vascular Endothelial Growth Factor) (Chatterjee et al. 2014, Furusato et al. 2010). Unter hypoxischen Bedingungen vermittelt die Aktivierung von HIF-1 α die Transkription von Genen, die aufgrund der verminderten Sauerstoffverfügbarkeit ihrerseits adaptive Signaltransduktionsprozesse zur Verbesserung der Sauerstoffversorgung, beispielsweise durch Angiogenese, induzieren (Nagaraju et al. 2015, Schioppa et al. 2003). Die Förderung der Angiogenese und Vaskularisation des Tumorgewebes bedingt nicht nur eine Verbesserung der Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff, sondern ebenfalls die beschleunigte Beseitigung von Stoffwechselendprodukten (Vandercappellen et al. 2008).

Neben der HIF-1 α -vermittelten Induktion der CXCR4-Expression begünstigt die intratumorale Abnahme der Sauerstoffkonzentration ebenso das Metastasierungsverhalten (Vandercappellen et al. 2008). Charakteristisch ist die gerichtete beziehungsweise gelenkte Metastasierung CXCR4-exprimierender Tumorzellen in Gewebe und Organe mit physiologisch hohen Konzentrationen an CXCL12/SDF-1 (Chatterjee et al. 2014, Teicher und Fricker 2010). Prädilektionsstellen sind folglich insbesondere die Gewebe von Leber, Lunge, Nieren, Gehirn und Knochenmark. CXCR4-positive Tumorzellen wandern, ähnlich wie Immunzellen oder hämatopoetische Stammzellen mit physiologischer CXCR4-Expression, entlang des Gradienten zur höchsten CXCL12/SDF-1-Konzentration. Invasivität und das Herauslösen von Tumorzellen aus ihrem Zellverband bilden die Grundlage für die Metastasierung von Tumoren. Der hierfür notwendige proteolytische Abbau von extrazellulärer Matrix und Basalmem-

branen wird durch Matrix-Metalloproteasen vermittelt, deren Expression Integrin- und CXCL12/SDF-1-abhängig gesteigert wird (Chatterjee et al. 2014, Singh et al. 2004, Vandercappellen et al. 2008). Weiterhin bewirkt die Aktivierung der CXCR4/CXCL12-Achse die Integrin-vermittelte Adhäsion zwischen Tumorzellen und Zellen der extrazellulären Matrix, wodurch eine gewisse Resistenz gegenüber der Chemotherapie-induzierten Apoptose entsteht. In verschiedenen Mausmodellen konnte ebenso ein positiver Zusammenhang zwischen einer hohen intratumoralen CXCL12/SDF-1-Konzentration und dem Tumorwachstum aufgezeigt werden. Die Interaktion von intratumoralem CXCL12/SDF-1 mit CXCR4-exprimierenden Immunzellen, Endothelzellen und Epithelzellen, einhergehend mit der gesteigerten Sekretion von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und proangiogenen Faktoren, wird als tumorwachstumsfördernd erachtet (Chatterjee et al. 2014).

Bei verschiedenen Tumorentitäten konnte die Korrelation der tumorspezifischen CXCR4-Expression und einer damit verbundenen Prognoseverschlechterung nachgewiesen werden. Die Detektion CXCR4-positiver Tumorzellen gilt somit als prognostisch ungünstiger Marker bezogen auf das Gesamtüberleben (Chatterjee et al. 2014).

2.2.4 Antagonisierung des CXCR4

Nach der Entdeckung der Korezeptorfunktion von CXCR4 bei der Aufnahme des Humanen Immundefizienz-Virus (HIV) in T-Lymphozyten ist der Entwicklung spezifischer CXCR4-Antagonisten eine hohe Bedeutung zugemessen worden. AMD3100 (Plerixafor) war die erste Verbindung, deren Wirksamkeit als CXCR4-Antagonist bei der Behandlung von HIV-Infektionen in klinischen Studien untersucht wurde (Scozzafava et al. 2002). Aufgrund mangelnder oraler Bioverfügbarkeit und dem Auftreten von kardialen Nebenwirkungen bei zwei Patienten während der Phase-II-Studie erlangte AMD3100 allerdings keine Zulassung zur antiretroviralen Therapie (Fricker et al. 2006). Durch Zufall ist innerhalb der klinischen Zulassungsstudien von Plerixafor ein Anstieg der Leukozyten im peripheren Blut festgestellt worden, der in nachfolgenden Untersuchungen auf die Mobilisation CD34-positiver hämatopoetischer Stammzellen aus dem Knochenmark zurückgeführt werden konnte (De Clercq 2015, DiPersio et al. 2009). Daraufhin erfolgte die Zulassung von AMD3100 in Kombination mit G-CSF zur Stammzellmobilisation mit Stammzellsammlung und autologer Transplantation bei Patienten mit multiplem Myelom oder Non-Hodgkin-Lymphom.

Die chemische Struktur von AMD3100 als sogenanntes Bicyclam ist durch zwei über eine Phenylengruppe verbundene Cyclam-Ringstrukturen gekennzeichnet (siehe Abbildung 1). AMD3100 weist im physiologischen pH-Bereich vier positive Ladungen auf, die aufgrund der Protonierung von jeweils zwei Stickstoffatomen der Cyclam-Ringe entstehen und die Bindung negativ geladener Aminosäurereste, wie die Carboxygruppen von Aspartat und Glutamat, ermöglichen (Fricker 2013, Teicher und Fricker 2010, Wong et al. 2008). Diese spezifische Wechselwirkung zwischen AMD3100 und extrazellulär gelegenen Anteilen des Chemokinrezeptors bedingt die Inhibition der CXCR4/CXCL-12-Interaktion sowie der nachfolgenden CXCL12/SDF1-vermittelten Signaltransduktionsprozesse des CXCR4, wobei keine Kreuzreaktivitäten zu anderen Chemokinrezeptoren bestehen.

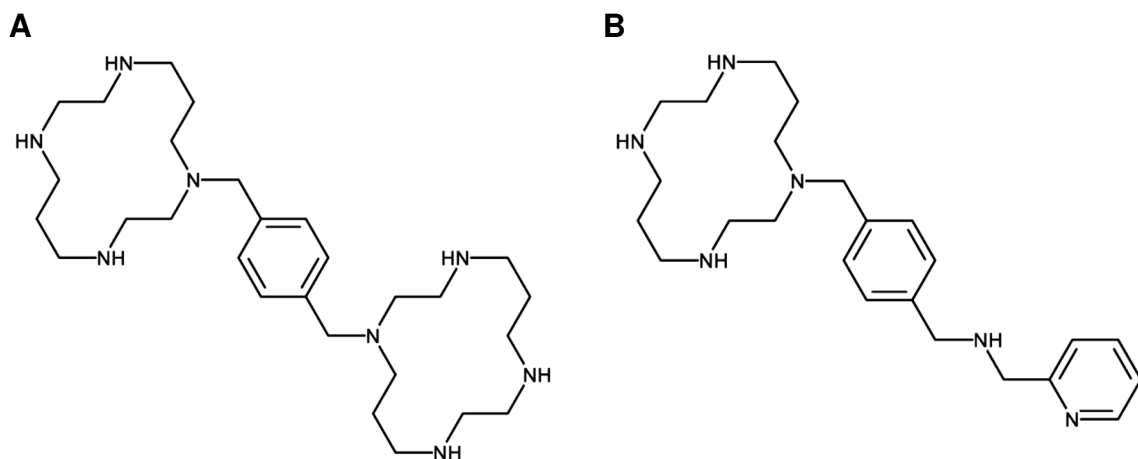


Abbildung 1: Chemische Strukturformeln des Bicyclams AMD3100 (Plerixafor) und des Monocyclams AMD3465. A: Plerixafor (AMD3100). B: AMD3465. Skelettformeln.

Neben AMD3100 (Plerixafor) wurden weitere nicht-peptidische CXCR4-Antagonisten, wie beispielsweise das Monocyclam AMD3465 sowie AMD11070, entwickelt, deren geringere Molekülgröße zu einer Verbesserung der oralen Bioverfügbarkeit beitrug (Wong et al. 2008). Darüber hinaus ist die Antagonisierung des CXCR4 über peptidische Antagonisten, unter anderem Polyphemusin, und monoklonale Antikörper möglich. In der Entwicklung neuer Therapieansätze zur Tumorbehandlung gilt der Chemokinrezeptor CXCR4 als vielversprechende Zielstruktur. Der Inhibition der CXCR4/CXCL12-Interaktion wird die Aufhebung der Wechselwirkung zwischen den Tumorzellen und deren umliegenden Tumormikromilieu zugesprochen, was die Sensibilisierung gegenüber chemotherapeutischen Behandlungen erhöhen und damit Einfluss auf Tumorwachstum und Metastasierung haben soll (Chatterjee et al. 2014).

2.3 Murine Lungentumor-Modelle

Zur Untersuchung der Pathogenese von Lungentumoren stellen Tiermodelle eine geeignete Möglichkeit dar, um die Komplexität der Tumorentstehung und des Therapieansprechens in vivo abzubilden. In-vitro-Methoden, wie unter anderem die Durchführung von Studien anhand von Zellkulturen, können diese komplexen Vorgänge nur bedingt nachbilden (de Seranno und Meuwissen 2010, Dutt und Wong 2006). Aufgrund der Ähnlichkeiten zwischen menschlicher und muriner Anatomie und Physiologie und der vergleichsweise einfachen Einflussnahme auf das Mausgenom eignen sich insbesondere Mausmodelle zur Evaluation diagnostischer Methoden, neuartiger Therapien und zielgerichteter Behandlungsoptionen (Dutt und Wong 2006). Ein weiterer Fokus liegt auf dem Erfassen molekularer, der Lungentumorentstehung und der Metastasierung zugrundeliegender Mechanismen sowie auf dafür verantwortlichen Mutationen, die beispielsweise die Gene für den EGF-Rezeptor oder den Tumorsuppressor p53 betreffen (Kellar et al. 2015). In den vergangenen Jahrzehnten sind zahlreiche murine Lungentumor-Modelle entwickelt worden. Hierbei können neben genetisch modifizierten Mausmodellen, wie den klassischen transgenen sowie Knock-out- und Knock-in-Mausmodellen, auch Xenograft-Modelle und chemisch induzierte Lungentumor-Modelle unterschieden werden.

Eines der ersten murinen Lungentumor-Modelle auf der Basis einer genetischen Modifikation des Mausgenoms bildeten klassische transgene Mausmodelle, bei denen die ektopre Expression entsprechender Transgene unter Kontrolle heterologer Promotoren zur Induktion von Lungentumoren führt (de Seranno und Meuwissen 2010). Hierzu erfolgt das Einbringen eines Transgen-tragenden Vektors mittels Mikroinjektion in eine befruchtete murine Eizelle mit anschließender Implantation in eine Leihmutter. Die Verwendung der Virusproteine E6 und E7 des Humanen Papillomavirus 16, die durch Bindung von p53 zu dessen Ubiquitylierung und Proteolyse beitragen, als Transgen in Kombination mit dem Keratin 5-Promotor ergibt somit die Bildung von Adenokarzinomen der Lunge (Meuwissen und Berns 2005). Die gewebespezifische Tumorbildung wird dabei durch den Promotor für Keratin 5 erreicht, eines in Basalzellen mehrschichtiger Epithelien vorkommenden Cytokeratins (Carraraesi et al. 2001). Trotz der möglichen Nachbildung einer Überexpression bestimmter Onkogene entsprechen die grundsätzliche Expression und die fehlenden Regulationsmöglichkeiten allerdings nicht dem tatsächlichen Expressionsmuster (Dutt und Wong 2006).

Als Weiterentwicklung des klassischen transgenen Mausmodells ermöglichen Knock-out- und Knock-in-Mausmodelle die gezielte Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen (Knock-out) beziehungsweise die gezielte Aktivierung von Onkogenen (Knock-in) in murinen embryonalen Stammzellen. Die auf diese Weise veränderten Stammzellen werden in die primäre Leibeshöhle eines wenige Tage alten Mausembryos injiziert, woraufhin die Implantation in eine Leihmutter erfolgt (Dutt und Wong 2006). Auch dieses Lungentumor-Modell führt zur Bildung von Adenokarzinomen, etwa durch K-ras-Aktivierung oder p53-Inaktivierung (de Seranno und Meuwissen 2010). Limitationen sind hierbei sowohl die durch Inaktivierung essentieller Tumorsuppressorgene bedingte embryonale Letalität, als auch das durch Inaktivierung nicht-essentieller Tumorsuppressorgene hervorgerufene breite Tumorspektrum, wobei Lungentumoren hieran lediglich einen geringen Anteil bilden. Durch die Aktivierung beziehungsweise Inaktivierung einzelner Gene kann außerdem die Komplexität der Tumorentstehung nicht nachempfunden werden (Dutt und Wong 2006).

Eine Alternative zu genetisch veränderten Mausmodellen stellen Xenograft-Modelle dar, die durch Injektion humaner Tumorzellen in immungeschwächte Empfängertiere charakterisiert sind. Die humanen Tumorzellen stammen dabei entweder von bestimmten Zelllinien oder von operativ entfernten Lungentumoren und können systemisch, subkutan oder orthotop, das heißt an die anatomisch korrekte Stelle, injiziert werden. Das Zellwachstum ist von verschiedenen Faktoren, wie dem Zelltypen und der Anzahl übertragener Zellen abhängig (Kellar et al. 2015). Aufgrund der möglichen Abstoßung implantierter humaner Tumorzellen bei immunkompetenten Mäusen besteht die Notwendigkeit der Injektion in immungeschwächte Empfängertiere. Indem Genexpression und histologische Eigenschaften den humanen Lungentumoren gleichen, kann deren Komplexität umso genauer nachempfunden werden. Hieraus ergibt sich die Möglichkeit zur Evaluation personalisierter Behandlungsstrategien (Gazdar et al. 2015, Kellar et al. 2015). Bestehende Unterschiede zwischen dem murinen und dem humanen Tumormikromilieu sowie der murine Ursprung des umgebenden Bindegewebes und des Gefäßsystems limitieren dieses Lungentumor-Modell hingegen (Gazdar et al. 2015, Meuwissen und Berns 2005).

Chemisch induzierte Lungentumor-Modelle erfassen den mehrstufigen Prozess zur Tumorentstehung und ähneln der Morphologie humaner Lungentumoren. Neben der

Induktion von Adenomen und Adenokarzinomen führen diese Tumormodelle auch zur Entstehung neuroendokriner Tumoren, wie dem kleinzelligen Bronchialkarzinom (Gazdar et al. 2015). Hierbei besteht die Notwendigkeit der Exposition oder des Verabreichens von Karzinogenen, etwa des vom Nikotin abgeleiteten Nitrosamin-Ketons NNK, zur Induktion von Mutationen. Unterschiede in der Verabreichung können hingegen Abweichungen in den Ergebnissen bedingen (Kellar et al. 2015).

2.3.1 NNK- und LPS-vermitteltes Lungentumor-Modell

In der Entstehung von malignen Lungentumoren scheint die chronische Lungenentzündung einen bedeutenden Faktor darzustellen. Epidemiologischen Untersuchungen entsprechend ist eine chronische Entzündung des Lungengewebes, einhergehend mit resultierenden Gewebeschäden, mit einer Erhöhung des Risikos bezüglich der Entwicklung von Lungentumoren assoziiert. Durch neutrophile Granulozyten im Rahmen der Entzündungsreaktion freigesetzte reaktive Sauerstoffverbindungen und Stickstoffverbindungen induzieren möglicherweise DNA-Schäden, die in Kombination mit Karzinogen-bedingten genetischen Veränderungen zur Tumorentstehung führen (Engels 2008, Weitzman und Gordon 1990). Die Arbeitsgruppe um Keohavong untersuchte diesen Zusammenhang unter Verwendung eines NNK- und LPS-vermittelten murinen Lungentumor-Modells (Keohavong et al. 2011). Die Tumorentstehung erfolgt hierbei auf der Basis einer chemischen Induktion mithilfe des vom Nikotin abgeleiteten Nitrosamin-Ketons NNK, eines potenten Karzinogens, auf dem Boden einer durch das Lipopolysaccharid gramnegativer Bakterien hervorgerufenen Lungenentzündung.

Keohavong et al. grenzten vier verschiedene Behandlungsgruppen von jeweils 15 Versuchstieren ab, die über einen Zeitraum von 16 Wochen entweder lediglich LPS beziehungsweise NNK oder die Kombination von LPS und NNK erhielten. Der vierten aus Kontrolltieren bestehenden Behandlungsgruppe wurde über denselben Zeitraum eine Natriumchlorid-Lösung verabreicht. Die LPS-Gabe wurde am ersten Tag jeder Woche über den gesamten Behandlungszeitraum mit 5 µg LPS in 30 µl Phosphatgepufferter Salzlösung durch intranasale Instillation, die NNK-Gabe am ersten und dritten Tag jeder Woche über die ersten vier Behandlungswochen mit 3 mg NNK in 200 µl Natriumchlorid-Lösung durch intraperitoneale Injektion durchgeführt.

Die anschließende histologische Beurteilung erbrachte den Nachweis von Adenomen und Adenokarzinomen bei allen mit NNK und LPS behandelten Versuchstieren. In der

Behandlungsgruppe, die lediglich NNK bekommen hatte, konnten Lungentumoren bei sieben Versuchstieren festgestellt werden. Demgegenüber entwickelten die Versuchstiere unter ausschließlicher LPS-Behandlung und die unbehandelten Kontrolltiere keine Lungentumoren. Während bei den Kontrolltieren histologisch gesundes Lungengewebe ohne eine Entzündungszellinfiltration nachgewiesen wurde, zeigten die Versuchstiere der LPS-Behandlungsgruppe eine überwiegend perivaskuläre Infiltration des Lungengewebes mit Entzündungszellen als Ausdruck einer Lungenentzündung.

2.3.2 Nikotin-abgeleitetes Nitrosamin-Keton NNK

Tabakrauch enthält eine Vielzahl karzinogen wirkender Substanzen, die an der Entstehung von Lungentumoren beteiligt sind. Als das am potentesten wirkende Karzinogen gilt hierbei das vom Nikotin abgeleitete Nitrosamin-Keton NNK (englisch: Nicotine-derived Nitrosamine Ketone), auch als 4-(Methyl-Nitrosamin)-1-(3-Pyridyl)-1-Butanon bezeichnet, das tabakspezifisch und daher in allen Tabakprodukten enthalten ist. NNK entsteht sowohl endogen in der Tabakpflanze, als auch bei der Trocknung und Nachbehandlung sowie der Verbrennung von Tabakblättern durch Nitrosierung des Tabakalkaloids Nikotin (Hecht 1998, Maser 2004). Die in Abbildung 2 dargestellten Skelettformeln verdeutlichen die chemische Ähnlichkeit von Nikotin und NNK. Während Nikotin sowohl einen Pyridin-Ring, als auch einen Pyrrol-Ring aufweist, zeigt NNK neben dem Pyridin-Ring einen aufgespaltenen Pyrrol-Ring. Die endständige Methylgruppe des NNK ist für dessen karzinogene Wirkung verantwortlich (Maser 2004). Da NNK eine inerte Verbindung darstellt, ist zur Entfaltung der Karzinogenität eine metabolische Aktivierung notwendig.

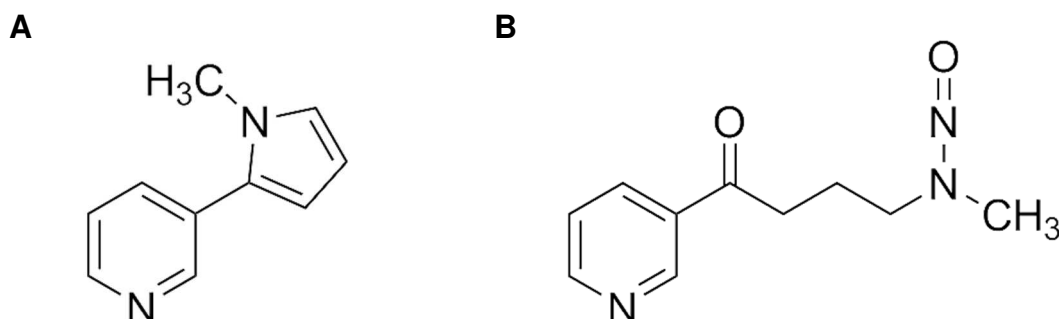


Abbildung 2: Chemische Strukturformeln von Nikotin und des vom Nikotin abgeleiteten Nitrosamin-Ketons (NNK). A: Nikotin. B: Nikotin-abgeleitetes Nitrosamin-Keton (NNK). Skelettformeln.

Die metabolische Umsetzung von NNK umfasst neben oxidativen auch reduktive Aktivierungswege, die Cytochrom-P450-abhängig zur Entstehung elektrophiler Verbindungen beitragen, welche zur Reaktion mit nukleophilen DNA-Bestandteilen imstande sind (Hecht et al. 2016). Hierbei erfolgen die Ausbildung von DNA-Addukten und die Alkylierung von DNA-Basen, was wiederum Basenfehlpaarungen und Mutationen begünstigt. NNK vermittelt somit die Bildung von Lungentumoren, insbesondere von Adenomen und Adenokarzinomen, durch unmittelbare Wechselwirkung mit der DNA (Akopyan und Bonavida 2006, Hecht et al. 2016).

Die reduktive Metabolisierung von NNK zum Nikotin-abgeleiteten Nitrosaminalkohol NNAL (englisch: Nicotine-derived Nitrosamine Alcohol) ist für die Einleitung der Detoxikation von NNK bedeutend. NNAL besitzt wie NNK eine karzinogene Wirkung. Die anschließende Glucuronidierung zu NNAL-Glucuronid ermöglicht letztlich die Exkretion dieses Metaboliten über den Urin (Maser 2004).

2.3.3 Bakterielle Lipopolysaccharide

Bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) bilden als Glykolipid einen Hauptbestandteil der Außenschicht der äußeren Membran gramnegativer Bakterien und grenzen als physikalische Barriere das Bakterium gegenüber seiner Umwelt ab (King et al. 2009). LPS besteht aus drei Komponenten, dem Lipid A, einem Core-Oligosaccharid und dem O-Antigen. Das Lipid A vermittelt als hydrophobe Domäne die Verankerung von LPS in der äußeren Membran und ist darüber hinaus für die biologische Wirkung von LPS als Endotoxin verantwortlich. Die Freisetzung der Endotoxine erfolgt beim Zerfall der gramnegativen Bakterien und führt zu einer Entzündungsreaktion. Das O-Antigen ist ein hoch variables, kovalent an das Core-Oligosaccharid gebundenes Polysaccharid (Maldonado et al. 2016). Es stellt die direkte Wechselwirkung mit dem umgebenden Milieu her und ist Vermittler bakterienspezifischer Oberflächeneigenschaften, wie dem Schutz vor Phagozytose oder Komplement-abhängiger Opsonierung (King et al. 2009). Die Verbindung zwischen dem hydrophoben Lipid A und dem hydrophilen O-Antigen bildet das Core-Oligosaccharid.

Eine chronische Exposition mit LPS ist aufgrund einer Entzündungsreaktion mit peribronchialer und perivaskulärer Entzündungszellinfiltration mit verschiedenen Lungenerkrankungen, unter anderem Asthma bronchiale, assoziiert, deren Risiko auch durch signifikante Mengen an LPS im Tabakrauch und durch eine entsprechende Exposition verstärkt werden kann (Hasday et al. 1999, Vernooy et al. 2002).

3 Ziele der Arbeit

Im Rahmen dieser Dissertation sollte ein möglichst realitätsnahes tierexperimentelles Lungentumor-Modell etabliert und charakterisiert werden, um auf dessen Grundlage die Suche nach neuen Zielstrukturen für die Diagnostik und die Therapie maligner Lungentumoren zu ermöglichen. Entsprechend dem von Keohavong et al. (2011) erstmals beschriebenen murinen Lungentumor-Modell erfolgte die Tumorinduktion in Mäusen hierbei mit dem vom Nikotin abgeleiteten Nitrosamin-Keton NNK und dem Lipopolysaccharid gramnegativer Bakterien. Eine mögliche zukünftige Zielstruktur für die Diagnose und die Therapie von Bronchialkarzinomen stellt der Chemokinrezeptor CXCR4 dar. Eine Überexpression dieses Rezeptors konnte in über 20 verschiedenen Tumorentitäten, unter anderem auch in Bronchialkarzinomen, nachgewiesen werden. Dem CXCR4 wird dabei unter anderem eine wichtige Funktion bei der Neoangiogenese, dem Wachstum, der Invasivität, der Metastasierung und der Chemotherapie-resistenz der Tumoren zugeschrieben. Hieraus ergab sich als weitere Zielsetzung die Charakterisierung der CXCR4-Expression in den mittels NNK und LPS induzierten Lungentumoren, die in zwei transgenen Mauslinien, in *Cxcr4-eGFP*-BAC-Mäusen und in *Cxcl12-Cxcl12RFP/Cxcr4-eGFP*-BAC-Mäusen, untersucht werden sollte. Durch die Expression von eGFP unter Kontrolle des murinen *Cxcr4*-Promotors in beiden transgenen Mauslinien sollte so der Nachweis einer tumoralen CXCR4-Expression indirekt mithilfe der natürlichen Autofluoreszenz des eGFP sowie unter Verwendung eines spezifischen Anti-eGFP-Antikörpers erbracht werden. Darüber hinaus sollte eine direkte Darstellung des CXCR4 mithilfe der Anti-CXCR4-Antikörper UMB-2 und 2B11, die an verschiedenen Stellen des CXCR4 binden, erfolgen. Aufgrund der Phosphosensitivität des Anti-CXCR4-Antikörpers UMB-2 sollte zusätzlich der Anteil phosphorylierter und unphosphorylierter, also durch den endogenen CXCR4-Liganden CXCL12/SDF-1 aktivierter und nicht aktivierter, Rezeptoren erfasst werden. Weiterhin sollten die NNK- und LPS-induzierten Lungentumoren hinsichtlich der Expression des CXCL12/SDF-1, des Proliferationsmarkers Ki-67, des neuroendokrinen Tumormarkers Chromogranin A und des Somatostatin-Rezeptors SSTR2 sowie, zur Abgrenzung CXCR4-exprimierender Immunzellen und Endothelzellen von Tumorzellen, hinsichtlich der Expression von CD11b, CD31, CD34, CD68 und Gr-1 charakterisiert und verglichen werden. In der *Cxcl12-Cxcl12RFP/Cxcr4-eGFP*-BAC-Mauslinie sollte schließlich ein Therapieversuch mit dem nicht-peptidischen CXCR4-Antagonisten AMD3100 (Plerixafor) durchgeführt werden.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Mausstämme und Behandlung

Die dieser Arbeit zugrundeliegenden Tierversuche sind vom Thüringer Landesamt für Verbraucherschutz (Registriernummer: 02-045/14) genehmigt worden. Die Durchführung der Untersuchungen erfolgte an männlichen, sieben Wochen alten *Cxcr4-eGFP*-BAC-Mäusen in einem Pilotversuch und gleichaltrigen *Cxcl12-Cxcl12RFP/Cxcr4-eGFP*-BAC-Mäusen im Hauptversuch. Die transgenen Mauslinien wiesen jeweils einen CD1-Hintergrund auf. In das Genom dieser transgenen Mausstämme wurden mehrere Kopien eines modifizierten BAC (englisch: Bacterial Artificial Chromosome) integriert, sodass ein *eGFP*-Reportergen (*eGFP*, englisch: enhanced Green Fluorescent Protein) unter Kontrolle des murinen *Cxcr4*-Promotors, beziehungsweise ein *Cxcl12RFP*-Fusionsprotein (*RFP*, englisch: Red Fluorescent Protein) unter Kontrolle des murinen *Cxcl12*-Promotors exprimiert wird (Bhattacharyya et al. 2008, Tran et al. 2007). Die Versuchstiere wurden im institutseigenen Tierhaus, das sich in den Räumen des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Jena befindet, jeweils zu zweit oder zu dritt in Typ-II-Makrolonkäfigen unter Standardbedingungen gehalten. Diese standardisierten Haltungsbedingungen umfassten den freien Zugang zu Futter (Altromin 1324-Maus-Haltungsfutter, Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage/Deutschland) und Wasser, eine Raumtemperatur von 22 ± 2 °C, eine Luftfeuchtigkeit von etwa 55 % sowie einen Tag/Nacht-Rhythmus von 12/12 Stunden.

Der dem Hauptversuch vorangestellte Pilotversuch mit 24 *Cxcr4-eGFP*-BAC-Mäusen über einen Zeitraum von 17 Wochen beabsichtigte die chemische Induktion von Lungentumoren mithilfe von NNK (Toronto Research Chemicals, Toronto/Kanada) und LPS (Sigma-Aldrich, Steinheim/Deutschland) und die Evaluation der Häufigkeit der Tumorentstehung im Vergleich zu den Ergebnissen der Arbeitsgruppe um Keohavong. Hierzu wurden zwei Behandlungsgruppen mit insgesamt 22 Mäusen von einer Kontrollgruppe mit zwei Mäusen abgegrenzt. Die zehn *Cxcr4-eGFP*-BAC-Mäuse in der ersten Behandlungsgruppe erhielten NNK und LPS, die zwölf Versuchstiere der zweiten Behandlungsgruppe ausschließlich LPS. Unter leichter Narkose mit Isofluran (Piramal Critical Care, Hallbergmoos/Deutschland) wurden jeweils am ersten Tag jeder Woche über den gesamten Untersuchungszeitraum 5 µg LPS in 30 µl Phosphat-

gepufferter Salzlösung durch intranasale Instillation und jeweils zweimal am ersten und dritten Tag jeder Woche über den Zeitraum der ersten vier Wochen 3 mg NNK in 200 µl Natriumchlorid-Lösung durch intraperitoneale Injektion verabreicht. Die Kontrollgruppe erhielt keine Behandlung.

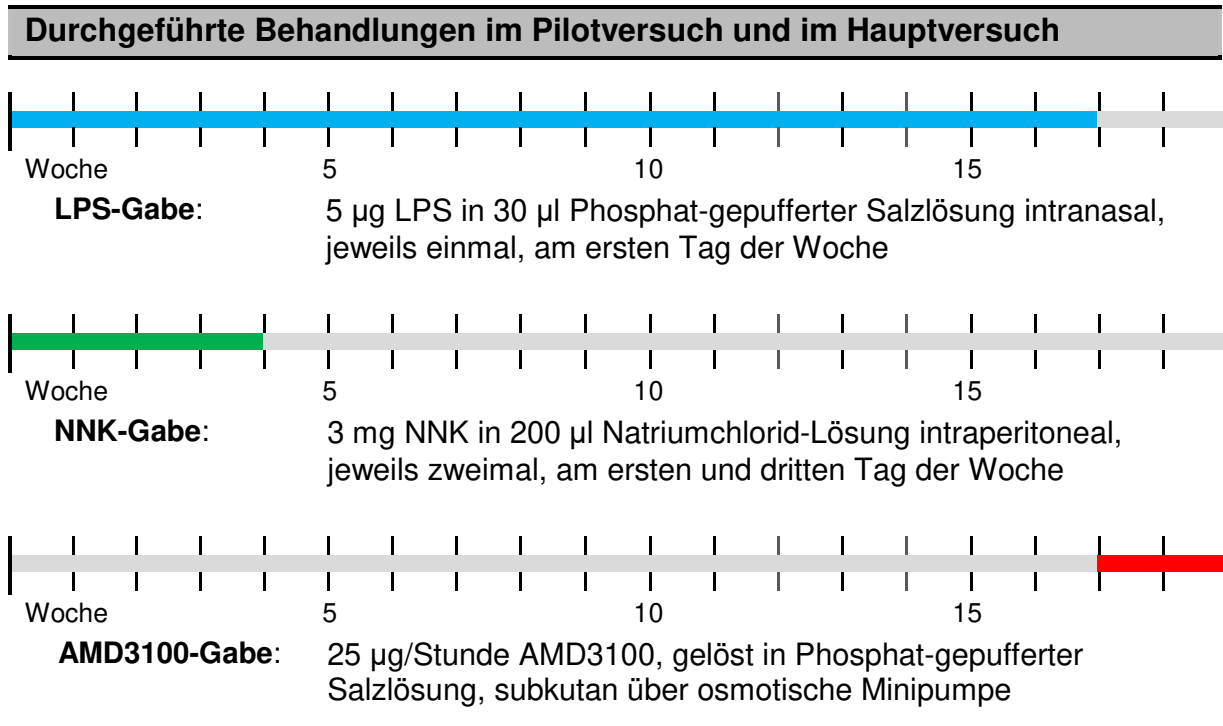


Abbildung 3: Darstellung der Gabe von LPS (blau), NNK (grün) und AMD3100 (rot).

Im Hauptversuch wurde die Wirkung des CXCR4-Antagonisten AMD3100 (Tocris Bioscience, Bristol/Großbritannien) hinsichtlich des Einflusses auf die analog zum Pilotversuch induzierten Bronchialkarzinome an 16 *Cxcl12-Cxcl12RFP/Cxcr4-eGFP-BAC*-Mäusen über einen Zeitraum von zwei Wochen untersucht. Es wurden hierbei zwei Behandlungsgruppen mit insgesamt zwölf Versuchstieren und eine Kontrollgruppe mit vier Mäusen unterschieden. Die neun *Cxcl12-Cxcl12RFP/Cxcr4-eGFP-BAC*-Mäuse in der ersten Behandlungsgruppe erhielten NNK und LPS, die drei Versuchstiere der zweiten Behandlungsgruppe NNK, LPS und AMD3100. Die Verabreichung von NNK und LPS erfolgte analog zum Pilotversuch. Die Kontrollgruppe erhielt wiederum keine Behandlung. Nach erfolgter 17-wöchiger Tumorinduktion wurde den Versuchstieren der zweiten Behandlungsgruppe über eine osmotische Minipumpe in Phosphat-gepufferter Salzlösung gelöstes AMD3100 mit einer Abgabegeschwindigkeit von 25 µg/Stunde subkutan über einen Zeitraum von zwei Wochen verabreicht. Die osmotische Minipumpe (ALZET Osmotic Pumps, DURECT Corporation, Cupertino, Kalifornien/USA) wurde hierzu in das Subkutangewebe unterhalb des rechten Schulterblatts

implantiert. Nach dem Ende der Behandlungen im Pilotversuch und im Hauptversuch erfolgte die Tötung der Versuchstiere in Isofluran-Narkose mit anschließender Entnahme der Mausorgane und sofortiger Fixierung in 10%ig gepuffertem Formalin. In Abbildung 3, Seite 29, sind die im Pilotversuch und im Hauptversuch durchgeführten Behandlungen mit LPS, NNK und AMD3100 dargestellt.

4.1.2 Chemikalien und Lösungen

In den Tabellen 3 und 4 sind die Art und die Herkunft verwendeter Chemikalien sowie eingesetzte Lösungen und deren Herstellung zusammengefasst.

Tabelle 3: Art und Herkunft verwendeter Chemikalien

Chemikalie	Lieferant und Herkunft
Aminoethylcarbazol	BioGenex, Fremont, Kalifornien/USA
Ammoniak-Lösung	Carl Roth GmbH, Karlsruhe/Deutschland
Carestream Kodak autoradiography GBX developer/replenisher	Sigma-Aldrich, Steinheim/Deutschland
Carestream Kodak autoradiography GBX fixer/replenisher	Sigma-Aldrich, Steinheim/Deutschland
Citronensäure-Monohydrat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe/Deutschland
DePex	Serva GmbH, Heidelberg/Deutschland
Diamidinphenylindol	Sigma-Aldrich, Steinheim/Deutschland
Diazabicyclooctan	Carl Roth GmbH, Karlsruhe/Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt/Deutschland
Eosin	Sigma-Aldrich, Steinheim/Deutschland
Essigsäureanhydrid	Sigma-Aldrich, Steinheim/Deutschland
Ethanol	Echter Nordhäuser Spirituosen GmbH, Nordhausen/Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe/Deutschland
Glycerin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe/Deutschland
Hämatoxylin	Sigma-Aldrich, Steinheim/Deutschland
Isopropanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe/Deutschland
Kaliumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt/Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt/Deutschland
Lambda-Protein-Phosphatase	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main/Deutschland
Methanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe/Deutschland
Mowiol 4-88	Carl Roth GmbH, Karlsruhe/Deutschland
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt/Deutschland

Natriumcitrat-Dihydrat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe/Deutschland
Natriumhydroxid	Merck KGaA, Darmstadt/Deutschland
Paraformaldehyd	Honeywell Specialty Chemicals Seelze GmbH, Seelze/Deutschland
Rinderserumalbumin	PAA Laboratories GmbH, Pasching/Österreich
RNase A	Roche Deutschland, Grenzach-Wyhlen/Deutschland
RNase T1	Roche Deutschland, Grenzach-Wyhlen/Deutschland
Thiomersal	AppliChem, Darmstadt/Deutschland
Tissue-Tek-O.C.T.-Compound	Sakura Finetec Germany GmbH, Staufen/Deutschland
Triethanolamin	Sigma-Aldrich, Steinheim/Deutschland
TRIS-Hydrochlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe/Deutschland
Triton X-100	Merck KGaA, Darmstadt/Deutschland
Wasserstoffperoxid-Lösung	Merck KGaA, Darmstadt/Deutschland
Xylol	Merck KGaA, Darmstadt/Deutschland

Tabelle 4: Übersicht über verwendete Lösungen und deren Herstellung

Lösung	Mengen	Chemikalien und Lösungen
Ammoniakwasser	1,4 ml ad 250 ml	Ammoniak-Lösung (25 %) Aqua bidestillata
Citrat-Puffer (0,01 M; pH 6,0)	18 ml 82 ml 900 ml	Stammlösung A Stammlösung B Aqua bidestillata
	pH-Einstellung mit Natriumhydroxid (2 M)	
Citrat-Puffer-Stammlösung A	21,01 g ad 1000 ml	Citronensäure-Monohydrat Aqua bidestillata
Citrat-Puffer-Stammlösung B	29,41 g ad 1000 ml	Natriumcitrat-Dihydrat Aqua bidestillata
Mowiol-Eindecklösung	6 g 2,4 g 12 ml 6 ml 25 mg/ml	Glycerin Mowiol 4-88 TRIS-Hydrochlorid (pH 8,5) Aqua bidestillata Diazabicyclooctan
Paraformaldehyd-Puffer (pH 7,4)	60 g 150 ml 1350 ml	Paraformaldehyd Phosphat-gepufferte Salzlösung Aqua bidestillata
	pH-Einstellung mit Natriumhydroxid (2 M)	

Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS; pH 7,4)	1,77 g	Dinatriumhydrogenphosphat
	0,24 g	Kaliumchlorid
	0,24 g	Kaliumdihydrogenphosphat
	8,18 g	Natriumchlorid
	ad 1000 ml	Aqua bidestillata
Phosphat-gepufferte Salzlösung mit Triton X (PBS-T)	6 ml	Triton X-100
	1500 ml	Phosphat-gepufferte Salzlösung
RNase A Stock	100 mg	RNase A
	15 ml	RNase A Stock-Puffer
RNase A Stock-Puffer	15 ml	TRIS-Hydrochlorid (pH 8,0)
	150 ml	Natriumchlorid-Lösung (5 M)
	3 ml	EDTA (0,5 M; pH 8,0)
	ad 1500 ml	Aqua bidestillata
RNase-Puffer	3 ml	RNase A Stock
	7,5 µl	RNase T1
	750 ml	RNase A Stock-Puffer
Standard-Natriumcitrat-Lösung (SSC, 20x; pH 6,3)	176 g	Natriumcitrat-Dihydrat
	350 g	Natriumchlorid
	ad 2000 ml	Aqua bidestillata
Thiomersal mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (TPBS)	1 g	Thiomersal
	ad 2000 ml	Phosphat-gepufferte Salzlösung
Thiomersal mit Phosphat-gepufferter Salzlösung und Triton X (TPBS-T)	1,5 ml	Triton X-100
	500 ml	TPBS
Triethanolamin-Puffer (pH 8,0)	20 ml	Triethanolamin
	1480 ml	Aqua bidestillata

Abkürzungen: EDTA - Ethylendiamintetraessigsäure, SSC - Standard-Natrium-Citrate

4.1.3 Verwendete Antikörper

In den Tabellen 5 und 6 sind die bei der immunhistochemischen Färbung an Formalin-fixierten und in Paraffin eingebetteten Präparaten und bei der Free-Floating-Methode verwendeten Primärantikörper sowie deren Antigenstrukturen, Klonbezeichnung, Verdünnung, Spezies, Klonalität und Bezugsquelle dargestellt. Die zusätzlich bei der immunhistochemischen Färbung verwendeten biotinylierten Sekundärantikörper entstammen dem Vectastain ABC-Kit, mouse IgG, rabbit IgG (Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien/USA) sowie dem AEC Substrate Pack (BioGenex, Fremont, Kalifornien/USA). Bei der Free-Floating-Methode wurden als Sekundärantikörper zusätzlich Alexa-Fluor-488-gekoppeltes goat anti-chicken IgG und Alexa-Fluor-555-gekoppeltes Streptavidin (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts/USA)

sowie biotinyliertes donkey anti-rabbit IgG oder donkey anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pennsylvania/USA) genutzt.

Tabelle 5: Übersicht über verwendete Primärantikörper

Antigen	Klon	Verdünnung	Spezies	Klonalität	Methode
CD11b	2LPM19c	1:2000	Maus	monoklonal	FFM
CD31	JC70A	1:1000	Maus	monoklonal	FFM
CD34	QBEnd 10	1:50	Maus	monoklonal	FFM, IHC
CD68	514H12	1:50	Maus	monoklonal	FFM
CgA	LK2H10	1:50	Maus	monoklonal	FFM, IHC
CXCR4	2B11	1:5000	Ratte	monoklonal	FFM
CXCR4	UMB-2	1:1	Kaninchen	monoklonal	FFM, IHC
eGFP		1:500	Huhn	polyklonal	FFM
eGFP		1:1000	Kaninchen	polyklonal	IHC
Gr-1	1A8-Ly6g	1:500	Ratte	monoklonal	FFM
Ki-67		1:2500	Kaninchen	polyklonal	FFM
Ki-67	MIB-1	1:50	Maus	monoklonal	IHC
SDF-1	79018	1:500	Maus	monoklonal	FFM, IHC
SSTR2	UMB-1	1:10	Kaninchen	monoklonal	IHC

Abkürzungen: CgA - Chromogranin A, FFM - Free-Floating-Methode, IHC - Immun-histochemie an Paraffinschnitten

Tabelle 6: Art und Herkunft verwendeter Primärantikörper

Antigen	Klon	Lieferant und Herkunft
CD11b	2LPM19c	Dako Denmark A/S, Glostrup/Dänemark
CD31	JC70A	Dako Denmark A/S, Glostrup/Dänemark
CD34	QBEnd 10	Dako Denmark A/S, Glostrup/Dänemark
CD68	514H12	Bio-Rad AbD Serotec GmbH, Puchheim/Deutschland
CgA	LK2H10	BioLogo, Kronshagen/Deutschland
CXCR4	2B11	BD Biosciences, Heidelberg/Deutschland
CXCR4	UMB-2	Epitomics, Burlingame, Kalifornien/USA
eGFP (FFM)		Aves Labs Inc., Tigard, Oregon/USA
eGFP (IHC)		Synaptic Systems GmbH, Göttingen/Deutschland
Gr-1	1A8-Ly6g	Affymetrix eBioscience, San Diego, Kalifornien/USA
Ki-67 (FFM)		Leica Biosystems, Nussloch/Deutschland
Ki-67 (IHC)	MIB-1	Dako Denmark A/S, Glostrup/Dänemark
SDF-1	79018	R&D Systems Inc., Minneapolis, Minnesota/USA
SSTR2	UMB-1	Epitomics, Burlingame, Kalifornien/USA

Abkürzungen: CgA - Chromogranin A, FFM - Free-Floating-Methode, IHC - Immun-histochemie an Paraffinschnitten

4.1.4 Geräte und Verbrauchsmaterial

Die nachstehende Tabelle 7 fasst die für die Methoden notwendigen und verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien zusammen.

Tabelle 7: Art und Herkunft verwendeter Geräte und Verbrauchsmaterialien

Material	Lieferant und Herkunft
Analysenwaage A200S	Sartorius AG, Göttingen/Deutschland
Deckgläser	Menzel-Gläser, Braunschweig/Deutschland
Färbeküvetten mit Deckel	Medite GmbH, Burgdorf/Deutschland
Glasfärbegestelle	Medite GmbH, Burgdorf/Deutschland
Heizplatte und Magnetrührer SLR	Schott Instruments, Mainz/Deutschland
Kodak BioMax MR Autoradiography Film	VWR, Radnor, Pennsylvania/USA
Kryomikrotom CM3050 S	Leica, Solms/Deutschland
Laser-Scanning-Mikroskop LSM 880	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena/Deutschland
Leica-Jung-Histokinette 2000	Leica, Solms/Deutschland
Mikroskop Axio Imager A1	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena/Deutschland
Mikrotommesser N35HR	Feather, Osaka/Japan
Mikrowelle CB 1271	Bomann, Kempen/Deutschland
Objektträger SuperFrost® plus	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts/USA
Paraffin-Gießautomat EG 1110	Leica, Solms/Deutschland
Rotationsmikrotom HM 335 E	Microm, Walldorf/Deutschland
Shandon Coverplates®	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts/USA
Shandon Sequenza®-Färbesystem	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts/USA

4.2 Methoden

4.2.1 Immunhistochemie an Paraffinschnitten

Die Immunhistochemie stellt eine Methode zur Lokalisierung und Sichtbarmachung bestimmter Zielstrukturen, wie beispielsweise von Membranbestandteilen oder Zellbestandteilen, unter Verwendung von spezifischen, gegen diese Strukturen gerichteten Antikörpern dar. Wiederum gegen diese Primärantikörper gerichtete Sekundärantikörper ermöglichen nicht nur eine Signalamplifikation, sondern auch die durch Wechselwirkung mit einem enzymgekoppelten Komplex entstehende Farbreaktion.

In Vorbereitung auf die immunhistochemische Färbung erfolgte die Einbettung der in Formalin fixierten Mausorgane in Paraffin. Hierzu wurden die Organe zunächst über eine aufsteigende Alkoholreihe in Paraffin überführt und in Blöcke gegossen. Anschließend wurden von diesen mithilfe eines Rotationsmikrotoms Gewebeschnitte mit einer Schichtdicke von 4 µm gewonnen und auf Adhäsionsobjektträger aufgebracht. Um die Voraussetzung für die immunhistochemische Färbereaktion zu schaffen, waren die Entparaffinierung der Gewebeschnitte mittels Xylol und dessen Entfernung durch Ethanol (100 %) erforderlich. Daraufhin folgte die Wasserstoffperoxid-vermittelte Blockierung der endogenen Peroxidase und Rehydrierung der Schnitte mittels absteigender Alkoholreihe. Beim Fixierungsprozess entstandene Quervernetzungen können zu einer Maskierung der Zielstrukturen führen, die als Antigene dadurch nicht von den Primärantikörpern erkannt werden können. Aus diesem Grund war in der vorliegenden Untersuchung eine Antigendemaskierung zur Verstärkung der Signalintensität durch wiederholtes Kochen in Citrat-Puffer notwendig. Um eine spezifische Bindung zwischen dem jeweiligen Primärantikörper und dessen Antigen zu erreichen, wurden im Rahmen der pH-Pufferung unterschiedliche Ladungen innerhalb des Gewebes mit Hilfe von Rinderserumalbumin abgesättigt und unspezifische Bindungen durch Zugabe eines normalen Serums aus derselben Spezies, aus der der Sekundärantikörper hergestellt wurde, blockiert. Dies schafft die Grundlage zur daraufhin folgenden Zugabe des Primärantikörpers und der spezifischen Antigenbindung.

Die immunhistochemische Färbung erfolgte in der vorliegenden Arbeit mithilfe der indirekten Peroxidase-Methode. Der gegen den Primärantikörper gerichtete Sekundärantikörper weist hierbei eine Kopplung mit Biotin auf, welches zur spezifischen Bindung mit Avidin fähig ist. Die Reaktion des biotinylierten Sekundärantikörpers mit

dem Avidin-Peroxidase-Komplex ist essentiell für die Färbereaktion, die durch die Wechselwirkung zwischen freiem Sauerstoff und dem Chromogen Aminoethylcarbazol vermittelt wird. Freier Sauerstoff entsteht dabei durch die Peroxidase-abhängige Katalyse von Wasserstoffperoxid. Das Resultat des Färbvorgangs ist eine rotbraune Färbung der Zielstrukturen, wobei die Färbereaktion letztlich durch Hinzugabe von bidestilliertem Wasser gestoppt wird, um eine Überfärbung zu verhindern. Schließlich erfolgte die Kernfärbung mit dem basischen Farbstoff Hämatoxylin, der zu einer Anfärbung anionischer Zellbestandteile wie beispielsweise DNA oder RNA führt. Durch wiederholtes Eintauchen in Ammoniakwasser und der damit verbundenen pH-Wert-Erhöhung wird die charakteristische Blaufärbung von Hämatoxylin erreicht. Eine detaillierte Beschreibung der einzelnen Arbeitsschritte zur immunhistochemischen Färbung ist der Tabelle 8 zu entnehmen.

Tabelle 8: Protokoll zur immunhistochemischen Färbung von Paraffinschnitten

Arbeitsschritt	Lösungen und Mengen	Inkubationszeit
1. Entparaffinierung	Xylol	3 x 20 Minuten
2. Entfernung des Xylols	Ethanol (100 %)	3 x 20 Minuten
3. Blockierung der endogenen Peroxidase zur Verhinderung einer unspezifischen Färbung	Wasserstoffperoxid (0,3 %) in Methanol	45 Minuten
4. Rehydrierung der Schnitte durch eine absteigende Alkoholreihe	Ethanol (95 %)	2 x 2 Minuten
	Ethanol (80 %)	2 Minuten
	Ethanol (70 %)	2 Minuten
	Aqua bidestillata	2 x 5 Minuten
5. Demaskierung der Antigene zur Verstärkung der Signalintensität	im Citratpuffer (0,01 M, pH 6,0):	
	Kochen	8 Minuten
	Abkühlen	4 Minuten
	Kochen	4 Minuten
	Abkühlen	4 Minuten
	Kochen	4 Minuten
6. Abkühlung der Präparate (30 Minuten) und anschließende Überführung in Aqua bidestillata (5 Minuten)		
7. pH-Pufferung	PBS mit RSA (1 %)	5 Minuten
8. Einsortierung der Objektträger in Sequenza-Färbesysteme (Entstehung eines kapillären Spalts zum Verabreichen der weiteren Lösungen)		
9. pH-Pufferung	PBS mit RSA (1 %), 1500 µl	

10.	Blockierung unspezifischer Bindungen zur Reduktion von Hintergrundfärbungen	normales Serum aus derselben Spezies wie der Sekundärantikörper, 150 µl	20 Minuten
11.	Antikörper-Bindung	spezifischer Antikörper, 300 µl	über Nacht bei 4 °C
12.	Spülen der Schnitte zur Entfernung unspezifisch gebundener Antikörper	PBS mit RSA (1 %), 2 x 1500 µl	
13.	Zugabe des Sekundärantikörpers	150 µl	30 Minuten
14.	Spülen der Schnitte	PBS mit RSA (1 %), 1500 µl	
15.	Zugabe des enzymgekoppelten Komplexes zur Ermöglichung der Färbereaktion	Avidin-Peroxidase-Komplex, 150 µl	30 Minuten
16.	Spülen der Schnitte	PBS mit RSA (1 %), 1500 µl	
17.	Färbung der Antikörper-gebundenen Bereiche	AEC, 150 µl	2 x 15 Minuten
18.	Stoppen der Färbereaktion durch Spülen	Aqua bidestillata, 1500 µl	
19.	Zurücksortierung der Präparate in die Glas-Färbeküvetten		
20.	Spülen der Schnitte	Aqua bidestillata	2 x 1 Minute
21.	Gegenfärbung	Hämatoxylin	3 Minuten
22.	Spülen der Schnitte	Aqua bidestillata	2,5 Minuten
23.	Hämatoxylin-Bläuung	Ammoniakwasser	5 x Eintauchen
24.	Spülen der Schnitte	Aqua bidestillata	2,5 Minuten
25.	Eindecken der Präparate mittels Mowiol und Deckgläsern		

Abkürzungen: AEC - Aminoethylcarbazol, PBS - Phosphat-gepufferte Salzlösung (englisch: Phosphate Buffered Saline), RSA - Rinderserumalbumin

4.2.2 Hämatoxylin-Eosin-Übersichtsfärbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Übersichtsfärbung gilt als weit verbreitetes Verfahren in der histologischen Beurteilung von Gewebeschnitten. Neben einer leichteren Orientierung und der verbesserten Detektion von Gewebeveränderungen innerhalb der Schnitte ist die HE-Übersichtsfärbung auch aufgrund des schnellen Färbevorgangs als Standardmethode etabliert. Elektrostatische Wechselwirkungen zwischen der dar-

zustellenden Struktur und dem Färbemittel bewirken die entsprechende Anfärbung. Als basischer Farbstoff ermöglicht Hämatoxylin die Kernfärbung zur Darstellung anionischer Zellstrukturen in blauvioletter Farbton. Eosin vermittelt als anionischer Farbstoff hingegen durch Bindung an kationische, basische Strukturen vor allem die rotbräunliche Anfärbung des Zytoplasmas.

Ähnlich der immunhistochemischen Färbung bildeten die Entparaffinierung durch Xylol und die anschließende Entfernung des Xylols mittels Ethanol (100 %) den Ausgangspunkt der HE-Übersichtsfärbung. Verwendet wurden ebenfalls Gewebeschnitte mit einer Dicke von 4 µm, die auf unbeschichtete Objektträger aufgebracht worden waren. Den Beginn des Färbeverfahrens bildete die Kernfärbung durch Hämatoxylin. Im Unterschied zur immunhistochemischen Färbung erfolgte die Hämatoxylin-Bläuung durch Leitungswasser mit der daraus resultierenden pH-Wert-Erhöhung. Daraufhin folgte die Eosin-vermittelte Anfärbung basischer Zellstrukturen. Um die Eindeckung der Präparate durch Depex zu ermöglichen, war eine Entwässerung der Schnitte durch Ethanol (100 %) und Xylol notwendig.

Eine detaillierte Beschreibung der einzelnen Arbeitsschritte zur Hämatoxylin-Eosin-Übersichtsfärbung ist der nachstehenden Tabelle 9 zu entnehmen.

Tabelle 9: Protokoll zur Hämatoxylin-Eosin-Übersichtsfärbung

Arbeitsschritt	Lösungen	Inkubationszeit
1. Entparaffinierung	Xylol	3 x 20 Minuten
2. Entfernung des Xylols	Ethanol (100 %)	3 x 20 Minuten
3. Spülen der Schnitte	Aqua bidestillata	2 x 2 Minuten
4. Kernfärbung	Hämatoxylin	30 Minuten
5. Spülen der Schnitte	Aqua bidestillata	1 Minute
6. Hämatoxylin-Bläuung	Leitungswasser	20 Minuten
7. Spülen der Schnitte	Aqua bidestillata	2 Minuten
8. Anfärbung basischer Zellstrukturen	Eosin	8 Minuten
9. Spülen der Schnitte	Aqua bidestillata	2 x 1 Minute 10 x Eintauchen
10. Entwässerung der Schnitte im Ethanol-Bad	Ethanol (100 %)	10 x Eintauchen 10 x Eintauchen 5 Minuten
11. Entwässerung der Schnitte im Xylol-Bad	Xylol	2 x 5 Minuten 2 Minuten
12. Eindecken der Präparate mittels Depex und Deckgläsern		

4.2.3 Immunhistochemie an Free-Floating-Schnitten

Die Free-Floating-Methode ermöglicht das Färben von in einer Pufferlösung freischwimmenden Gewebeschnitten, bevor diese auf Objektträger aufgebracht werden, da in Paraffin eingebettete Schnitte nicht jedem Färbeverfahren zugänglich sind. Für die Free-Floating-Methode erfolgte hierzu eine Fixierung der Mausorgane in 10%ig gepuffertem Formalin über Nacht mit anschließender Überführung in TPBS mit 30 % Saccharose bis zum sichtbaren Absinken. Schließlich wurden die auf diese Weise vorbehandelten Mausorgane in Tissue-Tek-O.C.T.-Compound bei einer Temperatur von -20 °C auf die Objekthalter des Kryomikrotoms aufgebracht und geschnitten. Die Gewebeschnitte, die eine Schichtdicke von 40 µm aufwiesen, wurden in TPBS eingelegt und auf eine Mikrotiterplatte überführt. Diese im Vergleich zu anderen Färbeverfahren höhere Schichtdicke ist aufgrund relativ hoher Scherkräfte beim Pipettieren der Lösungen sowie beim Ausstreichen der Schnitte auf die Objektträger mithilfe von Pinseln erforderlich. Da die Free-Floating-Methode insgesamt an drei aufeinanderfolgenden Tagen mit zwei Inkubationen über Nacht durchgeführt wird, besteht die Notwendigkeit der Zugabe des Konservierungsmittels Thiomersal zur Phosphatgepufferten Salzlösung.

Den Ausgangspunkt des Färbeverfahrens mittels Free-Floating-Methode bildete die Permeabilisierung lipophiler Grenzmembranen durch das 30-minütige Einwirken einer Methanol/TPBS-Lösung, welche mithilfe des Detergens Triton X aufrechterhalten wurde. Daraufhin erfolgte die Zugabe des Primärantikörpers mit anschließender spezifischer Antigenbindung bei einer Inkubation über Nacht. Das mehrmalige Spülen der Schnitte und die nahezu vollständige Entfernung der auf die Mikrotiterplatte aufgetragenen Lösungen dienen jeweils der Vermeidung von Unreinheiten und Verdünnungen. Der am zweiten Tag hinzugegebene Sekundärantikörper wies eine Kopplung mit Biotin auf, das eine spezifische Bindung mit dem Avidin des Avidin-Peroxidase-Komplexes eingeht. Um eine Signalamplifikation zu erreichen, wurden biotinylierte Tyramin-Moleküle verwendet, die sich nach deren Aktivierung durch die bereits indirekt am Antigen gebundene Peroxidase in unmittelbarer Nähe des Antigens ablagerten. Das Fluorophor-gekoppelte Streptavidin ist schließlich der kovalenten Bindung an Biotin fähig und diente der Darstellung der zu untersuchenden Antigenstrukturen. Auch die Wechselwirkung des Streptavidins mit Biotin erfolgte über Nacht. Zur Darstellung der Zellkernstrukturen wurde der Fluoreszenzfarbstoff

Diamidinphenylindol (DAPI) eingesetzt, der spezifische Bindungen mit der DNA und der RNA eingeht. Diese Kernfärbung erlaubt die Beurteilung der Lokalisation der dargestellten Antigene sowie die Abgrenzung von Zellen mit beziehungsweise ohne Antigenstrukturen.

Eine detaillierte Beschreibung der einzelnen Arbeitsschritte zur Free-Floating-Methode ist der Tabelle 10 zu entnehmen.

Tabelle 10: Protokoll zur Free-Floating-Methode

Arbeitsschritt	Lösungen	Inkubationszeit
1. Spülen der Schnitte	TPBS	20 Minuten
2. Permeabilisierung der Schnitte	Methanol/TPBS	30 Minuten
3. Spülen der Schnitte	TPBS-T	3 x 5 Minuten
4. Blockierung unspezifischer Bindungen	TPBS-T mit RSA (3 %)	60 Minuten
5. Zugabe des Primärantikörpers	Primärantikörper in TPBS-T mit RSA (1 %)	über Nacht
6. Spülen der Schnitte	TPBS-T	3 x 5 Minuten
7. Zugabe des Sekundärantikörpers	Sekundärantikörper in TPBS-T mit RSA (1 %)	120 Minuten
8. Spülen der Schnitte	TPBS-T	3 x 5 Minuten
9. Zugabe des enzymgekoppelten Komplexes zum Ermöglichen der Färbereaktion	Avidin-Peroxidase-Komplex	60 Minuten
10. Spülen der Schnitte	TPBS-T	3 x 5 Minuten
11. Signalamplifikation	Biotin/Tyramin	20 Minuten
12. Spülen der Schnitte	TPBS-T	3 x 5 Minuten
13. Signalamplifikation	Streptavidin in TPBS-T mit RSA (1 %)	über Nacht
14. Spülen der Schnitte	TPBS	3 x 5 Minuten
15. DAPI-Färbung der Schnitte	DAPI	2,5 Minuten
16. Spülen der Schnitte	TPBS	3 x 5 Minuten
17. Aufziehen der Schnitte auf Objektträger mit anschließender Lufttrocknung		
18. Eintauchen in Xylol-Bad, Eindecken der Präparate mittels Depex und Deckgläsern		

Abkürzungen: DAPI - Diamidinphenylindol, RSA - Rinderserumalbumin, TPBS - Thiomersal mit Phosphat-gepufferter Salzlösung, TPBS-T - Thiomersal mit Phosphat-gepufferter Salzlösung und Triton X-100

4.2.4 In-situ-Hybridisierung

Die In-situ-Hybridisierung ist ein Verfahren zur Untersuchung des Vorhandenseins von Nukleinsäuren. Hierfür werden spezielle Sonden, die komplementär gegen die nachzuweisende Nukleinsäure gerichtet sind, eingesetzt. Auf diese Weise kann beispielsweise die gewebespezifische Expression des Chemokinrezeptors CXCR4 durch den Nachweis der *Cxcr4*-mRNA aufgezeigt werden. Aufgrund der höheren Sensitivität der RNA:RNA-In-situ-Hybridisierung im Vergleich zur DNA:RNA-In-situ-Hybridisierung, wurden für den *Cxcr4*-mRNA-Nachweis RNA-Sonden verwendet. Die Nukleotide ^{35}S -CTP und ^{35}S -UTP waren mit dem radioaktiven Schwefelisotop ^{35}S markiert.

Ohne eine vorhergehende Formalin-Fixierung wurden die Lungen direkt in Tissue-Tek-O.C.T.-Compound eingefroren, woraufhin die Anfertigung von 14 µm dicken Gewebeschnitten und das Aufbringen auf beschichtete Objektträger erfolgten. Zur Vorbehandlung dieser Schnitte ging der In-situ-Hybridisierung eine Prähybridisierung voraus. Hauptanliegen waren hierbei die Permeabilisierung lipophiler Grenzmembranen mithilfe des Triton-Puffers und die Reduktion einer unspezifischen Hintergrundfärbung. Letzteres wurde durch die Essigsäureanhydrid-vermittelte Neutralisation positiver Ladungen erreicht. Es folgten die Entwässerung der Schnitte in Isopropanol und schließlich deren Trocknung. Eine ausführliche Beschreibung der einzelnen Arbeitsschritte für die Prähybridisierung ist der nachstehenden Tabelle 11 zu entnehmen.

Für die In-situ-Hybridisierung war nun das Aufbringen von jeweils 40 µl der RNA-Sonde in Hybridisierungspuffer und einem Deckglas auf die Objektträger essentiell. Die Hybridisierung, also die Bindung der RNA-Sonde an komplementäre Nukleinsäuren, erfolgte für 14-36 Stunden bei einer Temperatur von 60 °C in einer Feuchtkammer aus Formamid und Wasser (1:1). Formamid ermöglicht als Carbonsäureamid mit entsprechender Polarität diese niedrige Hybridisierungstemperatur durch die Abschwächung von Wasserstoffbrückenbindungen. Dies bewahrt die Gewebeschnitte vor potentiellen Hitzeschäden. Um lediglich spezifische RNA:RNA-Hybridisierungen zu detektieren, müssen ungebundene oder nur schwach gebundene RNA-Sonden nach vorsichtiger Entfernung des Deckglases mithilfe stringenter Waschschrte in SSC unterschiedlicher Konzentrationen sowie in RNase-Puffer entfernt werden. Eine detaillierte Beschreibung des Waschvorgangs ist in der nachstehenden Tabelle 12 dargestellt. Von entscheidender Bedeutung war schließlich die Sichtbarmachung der Bindungsstellen der radioaktiv markierten Sonden, um das mRNA-Expressionsmuster zu charakterisieren. Nach dem Auftragen einer silberhaltigen Fotoemulsion auf die

Objektträger akkumulierten sich aufgrund der Wechselwirkung mit dem radioaktiven Isotop ^{35}S kleine Silberkörnchen, die lichtmikroskopisch nachgewiesen werden können. Dieses Nachweisverfahren wird als Autoradiographie bezeichnet. Die Möglichkeit der gewebespezifischen Beurteilung wurde letztlich durch den Vergleich mit sequentiellen HE-gefärbten Gewebeschnitten erbracht.

Tabelle 11: Protokoll zur Prähybridisierung

Arbeitsschritt	Lösungen und Mengen	Inkubationszeit
1. Fixierung der Schnitte	Paraformaldehyd-Puffer	60 Minuten
2. Spülen der Schnitte	PBS	3 x 10 Minuten
3. Permeabilisierung der Schnitte	PBS-T	10 Minuten
4. Kurzes Eintauchen in PBS und Aqua bidestillata		
5. Acetylierung positiver Ladungen zur Reduktion von Hintergrundfärbungen	Triethanolamin-Puffer + Essigsäureanhydrid, 1880 µl	1 Minute 10 Minuten
6. Spülen der Schnitte	PBS Aqua bidestillata	10 Minuten 2 Minuten
7. Entwässerung der Schnitte im Isopropanol-Bad	Isopropanol (50 %) Isopropanol (70 %)	2 Minuten 2 Minuten
8. Flaches Auslegen und Trocknen der Objektträger bis zu zwei Stunden bei Raumtemperatur		

Abkürzungen: PBS - Phosphat-gepufferte Salzlösung (englisch: Phosphate Buffered Saline), PBS-T - Phosphat-gepufferte Salzlösung und Triton X-100

Tabelle 12: Protokoll zur Durchführung stringenter Waschschrte

Arbeitsschritt	Lösungen	Inkubationszeit
1. Entfernung ungebundener, nicht-hybridisierter RNA	2x SSC 1x SSC	20 Minuten 20 Minuten
2. Entfernung schwach gebundener oder nicht-hybridisierter RNA	RNase-Puffer (42 °C)	20 Minuten
3. Kurzes Eintauchen in 1x SSC		
4. Entfernung ungebundener, nicht-hybridisierter RNA	0,2x SSC 0,2x SSC (60 °C) 0,2x SSC	20 Minuten 60 Minuten 10 Minuten
5. Spülen der Schnitte	Aqua bidestillata	10 Minuten
6. Entwässerung der Schnitte im Isopropanol-Bad	Isopropanol (50 %) Isopropanol (70 %)	2 Minuten 2 Minuten
7. Flaches Auslegen und Trocknen der Objektträger		

Abkürzungen: RNA - Ribonukleinsäure, SSC - Standard-Natrium-Citrate

4.2.5 Auswertung und verwendete Computerprogramme

Die Auswertung der histologischen Präparate erfolgte deskriptiv am Mikroskop Axio Imager A1 (Immunhistochemie, In-situ-Hybridisierung) beziehungsweise am Laser-Scanning-Mikroskop LSM 880 (Free-Floating-Methode). Am Laser-Scanning-Mikroskop LSM880 wurde eGFP mithilfe eines Argon-Ionen-Lasers und einer Anregungswellenlänge von 488 nm mit grüner Fluoreszenz, die entsprechenden Markerproteine (CD11b, CD31, CD34, CD68, CXCL12/SDF-1, CXCR4, Gr-1 und Ki-67) mithilfe eines Helium-Neon-Lasers und einer Anregungswellenlänge von 543 nm mit roter Fluoreszenz und DAPI mithilfe eines Diodenlasers und einer Anregungswellenlänge von 405 nm mit blauer Fluoreszenz nachgewiesen.

Die durch das Laser-Scanning-Mikroskop LSM 880 erstellten Aufnahmen in 100facher und 200facher Vergrößerung erforderten aufgrund des besonderen Dateiformats eine Bearbeitung mithilfe des Bildverarbeitungsprogramms ImageJ (Schneider et al. 2012, Schindelin et al. 2015).

Die chemischen Strukturformeln von AMD3100 und AMD3465 wurden mit dem Programm MarvinSketch (ChemAxon, Budapest/Ungarn), die chemischen Strukturformeln von Nikotin und des vom Nikotin abgeleiteten Nitrosamin-Ketons NNK mit dem Programm ChemBioDraw Ultra 14.0 (PerkinElmer, Cambridge, Massachusetts/USA) erstellt.

5 Ergebnisse

5.1 Pilotversuch zur Tumorinduktion mit NNK und LPS

Nach der Behandlung der *Cxcr4-eGFP*-BAC-Mäuse mit NNK und LPS erfolgte die makroskopische und mikroskopische Tumordetektion in den zehn behandelten Mäusen sowie in den zwei unbehandelten Kontrolltieren. Unter Anwendung verschiedener Untersuchungsverfahren wurde der Nachweis des Chemokinrezeptors CXCR4 in Normalgeweben und in Tumorgeweben erbracht. Zur weiteren Charakterisierung dieser CXCR4-positiven Zellen wurde zusätzlich die Expression weiterer Markerproteine untersucht.

Eine detaillierte Übersicht zu den im Pilotversuch angewandten Untersuchungsmethoden und analysierten Markern ist in Abbildung 4 dargestellt.

Pilotversuch Tumorinduktion mit NNK und LPS		
Histologie	Free-Floating-Methode	In-situ Hybridisierung
<ul style="list-style-type: none"> - HE-Übersichtsfärbung - Immunhistochemie <ul style="list-style-type: none"> • CD34 • Chromogranin A • CXCL12/SDF-1 • CXCR4 (UMB-2 ± LPP) • eGFP • Ki-67 • SSTR2 	<ul style="list-style-type: none"> - Fluoreszenzmikroskopie <ul style="list-style-type: none"> • CD11b • CD31 • CD34 • CD68 • CXCL12/SDF-1 • CXCR4 (UMB-2 ± LPP, 2B11) • eGFP • Gr-1 • Ki-67 	<ul style="list-style-type: none"> - mRNA-Nachweis <ul style="list-style-type: none"> • <i>Cxcr4</i>-mRNA • <i>Cxcl12/SDF-1</i>-mRNA • <i>SDF-1α</i>-mRNA • <i>SDF-1β</i>-mRNA • <i>SDF-1γ</i>-mRNA

Abbildung 4: Übersicht über die im Pilotversuch angewandten Untersuchungsmethoden sowie die jeweils dargestellten Markerproteine.

Zusätzlich zur Charakterisierung der Lungentumorgewebe wurden als Nebenzielgröße die Tiergewichte ermittelt. Die nachstehende Abbildung 5 veranschaulicht die Tiergewichtsentwicklung der zehn Behandlungstiere während der 17-wöchigen Behandlungszeit mit NNK und LPS sowie der zwei nicht behandelten Kontrolltiere in demselben Untersuchungszeitraum. In dem Liniendiagramm sind hierbei die Mittelwerte der Tiergewichte der Behandlungstiere und der Kontrolltiere sowie die Standardabweichungen (SD) aufgetragen. Die Tiergewichtsmessung erfolgte einmal wöchentlich.

Zu Beginn des Untersuchungszeitraums wiesen die Mäuse ein durchschnittliches Tiergewicht von 36,28 g auf.

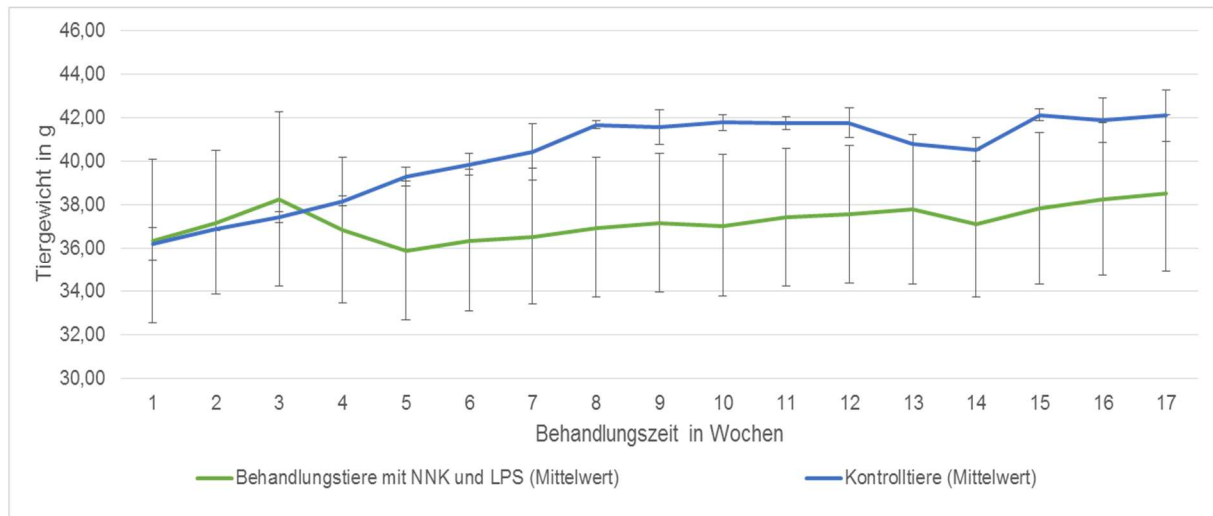


Abbildung 5: Entwicklung der Tiergewichte von mit NNK und LPS behandelten *Cxcr4-eGFP*-BAC-Mäusen (grün) während der 17-wöchigen Behandlungszeit sowie der Tiergewichte entsprechender Kontrolltiere ohne Behandlung mit NNK und LPS (blau). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD; n = 10 (Behandlungstiere mit NNK und LPS), n = 2 (Kontrolltiere).

Bei den Kontrolltieren konnte bis zur achten Untersuchungswoche ein steiler Gewichtsanstieg auf durchschnittlich 41,65 g mit daraufhin folgender Stagnation des Tiergewichts zwischen 41,00 g und 42,00 g bis zur zwölften Untersuchungswoche verzeichnet werden. Anschließend fand sich bis zum Ende des Untersuchungszeitraums ein leicht fluktuierender Gewichtsverlauf mit weiterhin ansteigender Tendenz. Die mit NNK und LPS behandelten Tiere zeigten bis zur dritten Behandlungswoche einen Gewichtsanstieg auf durchschnittlich 38,28 g, gefolgt von einer deutlichen Gewichtsreduktion auf durchschnittlich 35,87 g mit Unterschreiten des Anfangsgewichts bis zur fünften Behandlungswoche. Im weiteren Verlauf konnte bis zum Ende des Untersuchungszeitraums ein stetiger Anstieg des Tiergewichts verzeichnet werden, ohne hierbei das Gewichtsniveau der Kontrolltiere zu erreichen. Am Ende des Untersuchungszeitraums in der 17. Behandlungswoche konnte noch immer ein deutlicher Unterschied der Tiergewichte von Behandlungstieren und Kontrolltieren nachgewiesen werden. Die Mäuse unter Behandlung mit NNK und LPS zeigten hier ein durchschnittliches Gewicht von 38,51 g, während die Kontrolltiere ein Gewicht von durchschnittlich 42,08 g aufwiesen. Hieraus ergab sich eine Gewichts Differenz von mehr als 3 g.

5.1.1 Makroskopischer und mikroskopischer Tumornachweis

Die Lungentumorentwicklung konnte nach der Organentnahme bereits makroskopisch nachgewiesen werden (siehe Abbildung 6). Das Nativpräparat wies mehrere, peripher im Lungengewebe befindliche Tumoren mit scharfer Abgrenzung zum Normalgewebe auf, bei denen es sich vermutlich um nichtkleinzellige Bronchialkarzinome oder entsprechende benigne Vorstufen handelt. Makroskopisch wurde darüber hinaus eine verstärkte eGFP-Expression in den Lungentumoren unter fluoreszierendem Licht beobachtet. Aufgrund der höheren Konzentration an grün fluoreszierendem Protein zeigten die makroskopisch erkennbaren Tumorgewebe eine deutlich stärkere Fluoreszenz als das umliegende tumorfreie Normalgewebe. In gesunden Lungengewebszellen war allenfalls eine schwache homogene eGFP-Expression mit homogener Fluoreszenz festzustellen.

Zur mikroskopischen Beurteilung der gebildeten Lungentumoren erfolgte zunächst die Anfertigung von Hämatoxylin-Eosin-Übersichtsfärbungen (siehe Abbildung 7, Seite 47). Hierbei gelang der Nachweis nichtkleinzelliger und kleinzelliger Lungentumoren mit charakteristischen morphologischen Merkmalen in allen mit NNK und LPS behandelten *Cxcr4-eGFP-BAC*-Mäusen. In peripheren, dem Lungenrand anliegenden Arealen konnten zahlreiche nichtkleinzellige Bronchialkarzinome beziehungsweise deren benigne Vorstufen mit scharfer Abgrenzung zum umliegenden Normalgewebe detektiert werden. Zentralen Bronchien oder Bronchiolen anliegend erschienen kleinzellige Tumorzellansammlungen und Bronchialkarzinome mit unscharfen Zellgrenzen und einem ungeordneten Wachstumsmuster. Mitunter zeigten sich Lungentumoren mit sowohl nichtkleinzelligen als auch kleinzelligen Tumorarealen.

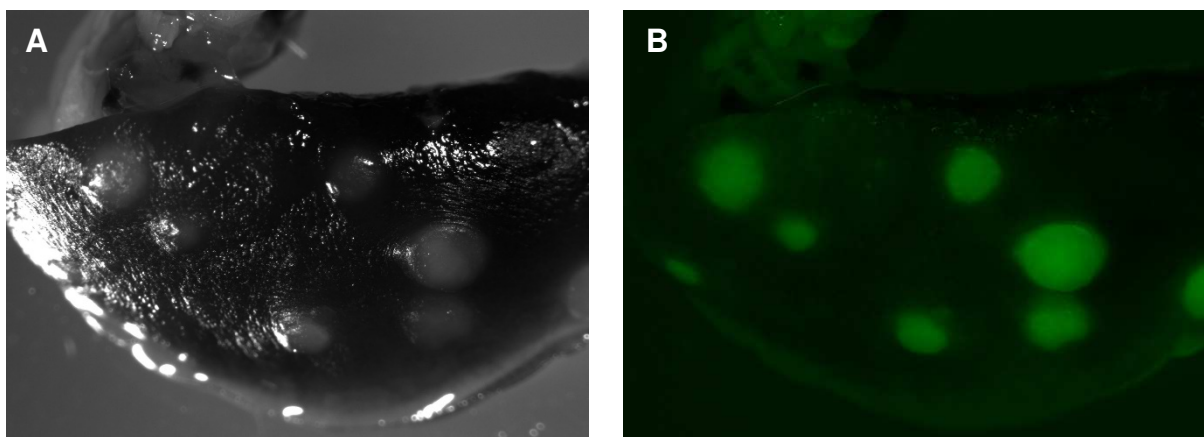


Abbildung 6: Makroskopische Darstellung der Lungentumoren (A) sowie der natürlichen Fluoreszenz von (Tumor-)Zellen durch die Expression des grün fluoreszierenden Proteins (B) einer mit NNK und LPS behandelten *Cxcr4-eGFP-BAC*-Maus.

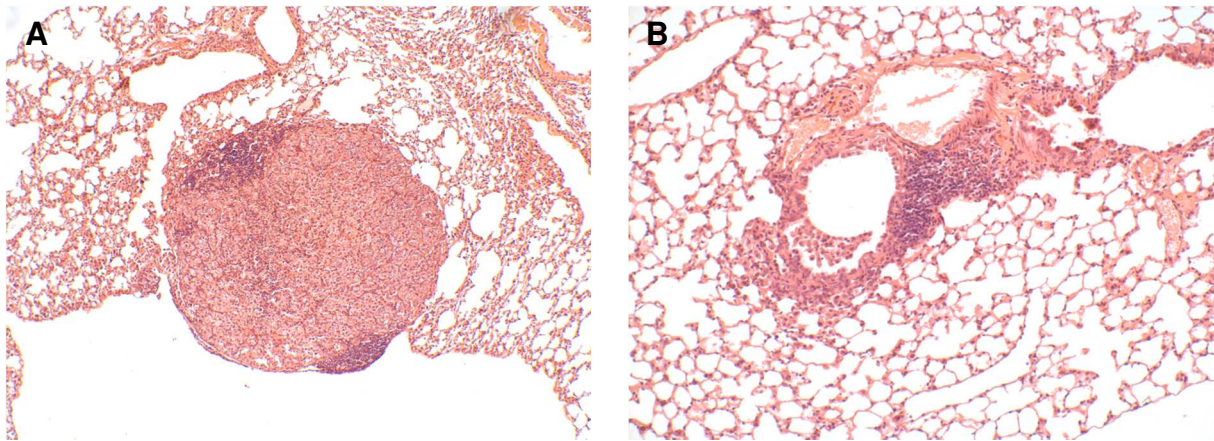


Abbildung 7: Mikroskopische Darstellung der Lungentumoren von mit NNK und LPS behandelten *Cxcr4-eGFP*-BAC-Mäusen. A: NSCLC. B: SCLC. Hämatoxylin-Eosin-Übersichtsfärbung. Originalvergrößerung: 100fach (A), 200fach (B).

5.1.2 Auswertung der Immunhistochemie an Paraffinschnitten

5.1.2.1 Expression des CXCR4

Die immunhistochemische Untersuchung der Expression des Chemokinrezeptors CXCR4 bestätigte das Vorhandensein CXCR4-positiver Zellen im gesunden Normalgewebe ebenso wie im Tumorgewebe nichtkleinzelliger und kleinzelliger Lungentumoren. Aufgrund der Phosphosensitivität des verwendeten Anti-CXCR4-Antikörpers UMB-2 konnten deutliche Unterschiede der Expressionsmuster in Abhängigkeit von der vorherigen Behandlung der Gewebeschnitte mit Lambda-Protein-Phosphatase (LPP) gezeigt werden. Die Dephosphorylierung des Chemokinrezeptors mittels LPP ermöglicht die Bindung von UMB-2 und damit die Darstellung des CXCR4 in unphosphoryliertem und dephosphoryliertem Zustand.

Im tumorfreien Normalgewebe gelang der Nachweis der CXCR4-Expression in solitären Zellen des Interstitiums und des Bronchialepithels mit starker zytoplasmatischer und membranständiger Anfärbung. Aufgrund ihrer Lokalisation und ihres solitären Auftretens stellen diese Zellen am ehesten CXCR4-exprimierende Immunzellen, wie Alveolarmakrophagen, Monozyten oder neutrophile Granulozyten dar. Insgesamt zeigte sich ein homogenes Verteilungsmuster. Ein vermehrtes Auftreten dieser Zellen konnte lediglich im Bereich des Bronchialepithels und in tumornahen Normalgewebsarealen festgestellt werden. Im Vergleich zur CXCR4-Darstellung ohne Behandlung mit LPP wurde nach Dephosphorylierung des CXCR4 eine Anfärbung mit stärkerer Intensität deutlich. Ebenso gelang die Detektion von mäßig CXCR4-positiven Zellen, die ohne LPP-Behandlung dem Nachweis entgingen.

Nichtkleinzellige Lungentumoren erbrachten mehrheitlich den Nachweis von solitären oder in kleinen Gruppen zusammenliegenden CXCR4-positiven Zellen mit mäßiger bis starker zytoplasmatischer Anfärbung und inhomogenem Verteilungsmuster. Insbesondere in peripheren Tumorbereichen und in gefäßnahen intratumoralen Arealen konnte eine höhere CXCR4-Expression nachgewiesen werden. Hierbei bestand eine erkennbare Abhängigkeit von der Tumorgroße, wobei die Expression in größeren Tumoren stärker ausgeprägt war. Nach LPP-Behandlung konnten eine deutliche Intensitätszunahme der Anfärbung bereits ohne Dephosphorylierung nachweisbarer Zellen sowie eine vermehrte Anzahl an CXCR4-Positivitäten aufgezeigt werden. In kleinzelligen Tumorzellansammlungen und Bronchialkarzinomen gelang ohne Behandlung mit LPP lediglich vereinzelt der Nachweis CXCR4-exprimierender Zellen mit mäßiger zytoplasmatischer und membranständiger Anfärbung. Durch die Dephosphorylierung konnte, wie auch bei den nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen und im tumorfreien Normalgewebe, eine deutliche Intensitätszunahme des Immunsignals erreicht werden. Die Expression des CXCR4 zeigte ein inhomogenes Verteilungsmuster, ohne eine bevorzugte Lokalisation der CXCR4-positiven Zellen im Tumor aufzuweisen.

5.1.2.2 Expression von eGFP

In der immunhistochemischen Darstellung der eGFP-Expression zeigten sich deutliche zytoplasmatische Anfärbungen von Normalgewebszellen mit homogenem Verteilungsmuster im Gewebe. Der Nachweis dieser eGFP-Positivitäten gelang hierbei in Bronchialepithelzellen sowie in Zellen des Interstitiums. Entsprechend ihrer Lokalisation im Lungengewebe und ihres solitären Auftretens handelt es sich auch hier am ehesten um Alveolarmakrophagen und andere Immunzellen.

Nichtkleinzellige Lungentumoren wiesen vor allem in peripher gelegenen Tumoralen eGFP-positive Zellen mit mäßiger bis starker Anfärbung auf, wobei wiederum eine Abhängigkeit von der Tumorgroße festgestellt werden konnte. In kleinzelligen Bronchialkarzinomen ließ sich hingegen eine höhere Konzentration der eGFP-exprimierenden Zellen mit deutlich stärkerer Anfärbung, jedoch ohne Aufzeigen bevorzugter Lokalisationsmuster im Tumorgewebe nachweisen. Unabhängig von der Tumor-entität wurde ein insgesamt inhomogenes Verteilungsmuster der eGFP-Expression verzeichnet. Die erwartungsgemäße Ähnlichkeit der Expressionsmuster von eGFP und CXCR4 konnte bestätigt werden, obgleich eine deutlich höhere Intensität der eGFP-Anfärbung und eine höhere Anzahl an Positivitäten, verglichen mit der immu-

histochemischen Darstellung des CXCR4, nachgewiesen werden konnten. Die nachstehende Abbildung 8 verdeutlicht diesen Befund durch die Gegenüberstellung der CXCR4-Expression ohne und mit vorheriger LPP-Behandlung der Gewebeschnitte mit der Expression von eGFP in nichtkleinzelligen und kleinzelligen Lungentumoren.

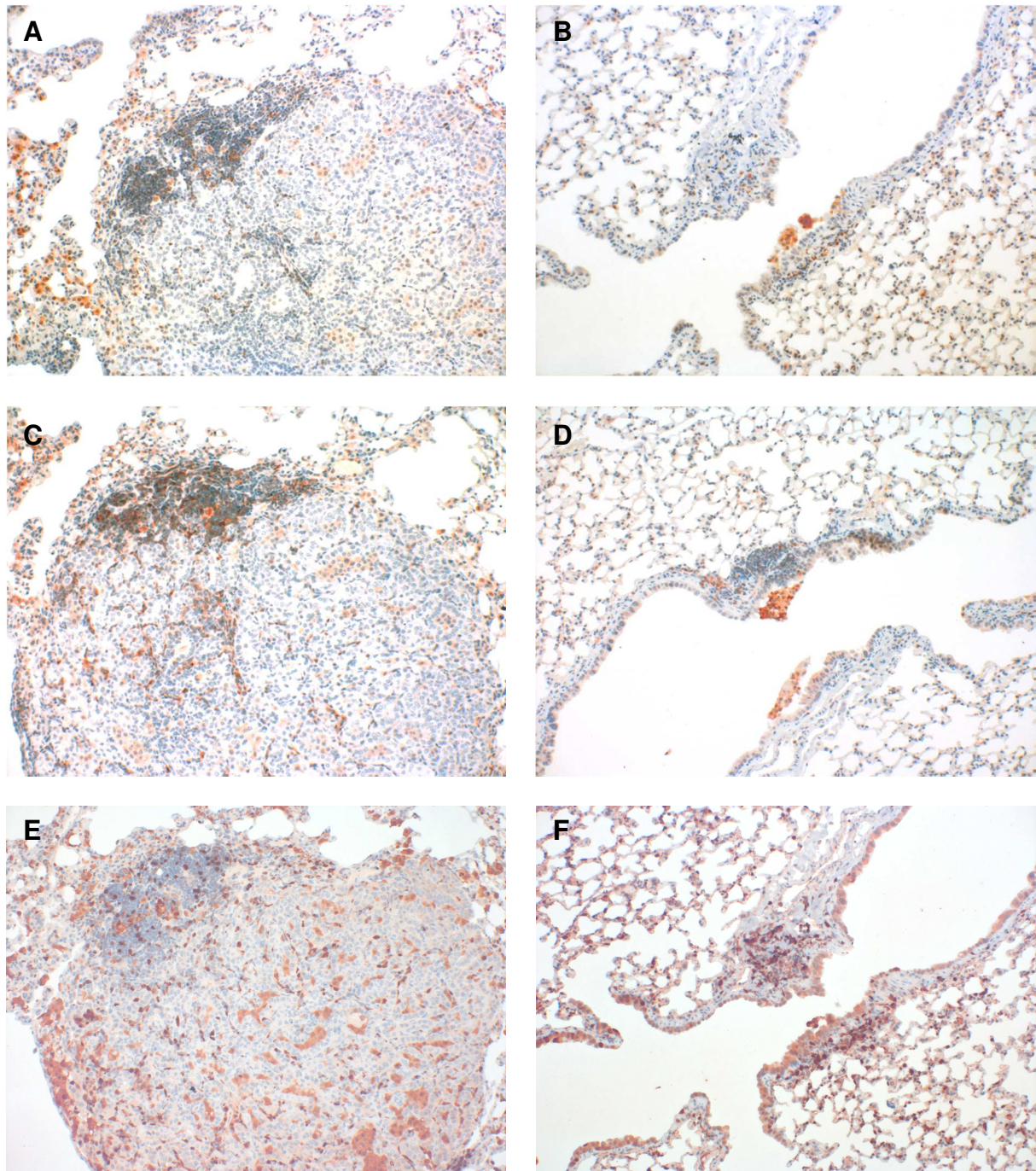


Abbildung 8: Nachweis der CXCR4-Expression unter Verwendung des Antikörpers UMB-2 ohne LPP-Behandlung (A, B), mit LPP-Behandlung (C, D) sowie eGFP-Expression (E, F) in Lungentumoren von mit NNK und LPS behandelten *Cxcr4-eGFP*-BAC-Mäusen. A, C, E: NSCLC. B, D, F: SCLC. Immunhistochemie (rotbraune Färbung, Gegenfärbung mit Hämatoxylin). Originalvergrößerung: 200fach (A-F).

5.1.2.3 Expression von CXCL12/SDF-1

Der endogene CXCR4-Ligand CXCL12/SDF-1 konnte innerhalb des Normalgewebes vor allem in Bronchialepithelzellen mit starker zytoplasmatischer Anfärbung nachgewiesen werden. In den übrigen Zellen des Normalgewebes war eine CXCL12/SDF-1-Expression mit mäßiger Anfärbung erkennbar.

Nichtkleinzellige Lungentumoren zeigten eine sehr variable CXCL12/SDF-1-Expression. Einerseits konnten Tumoren mit einer homogenen, mäßig bis starken CXCL12/SDF-1-Anfärbung nachgewiesen werden, andererseits waren in anderen Lungentumoren auffallende Inhomogenitäten mit CXCL12/SDF-1-freien Arealen zu erkennen. In kleinzelligen Bronchialkarzinomen konnten hingegen nur wenige, schwache bis mäßige Positivitäten aufgezeigt werden. Den Tumorentitäten gemeinsam war das inverse Expressionsmuster des CXCL12/SDF-1 und des CXCR4. Tumorbereiche mit einer hohen CXCR4-Expression zeichneten sich durch eine geringe CXCL12/SDF-1-Expression aus. Ebenso zeigten sich in Arealen mit niedrigen CXCR4-Konzentrationen hohe Level an CXCL12/SDF-1 (siehe Abbildung 8, Seite 49, und Abbildung 9).

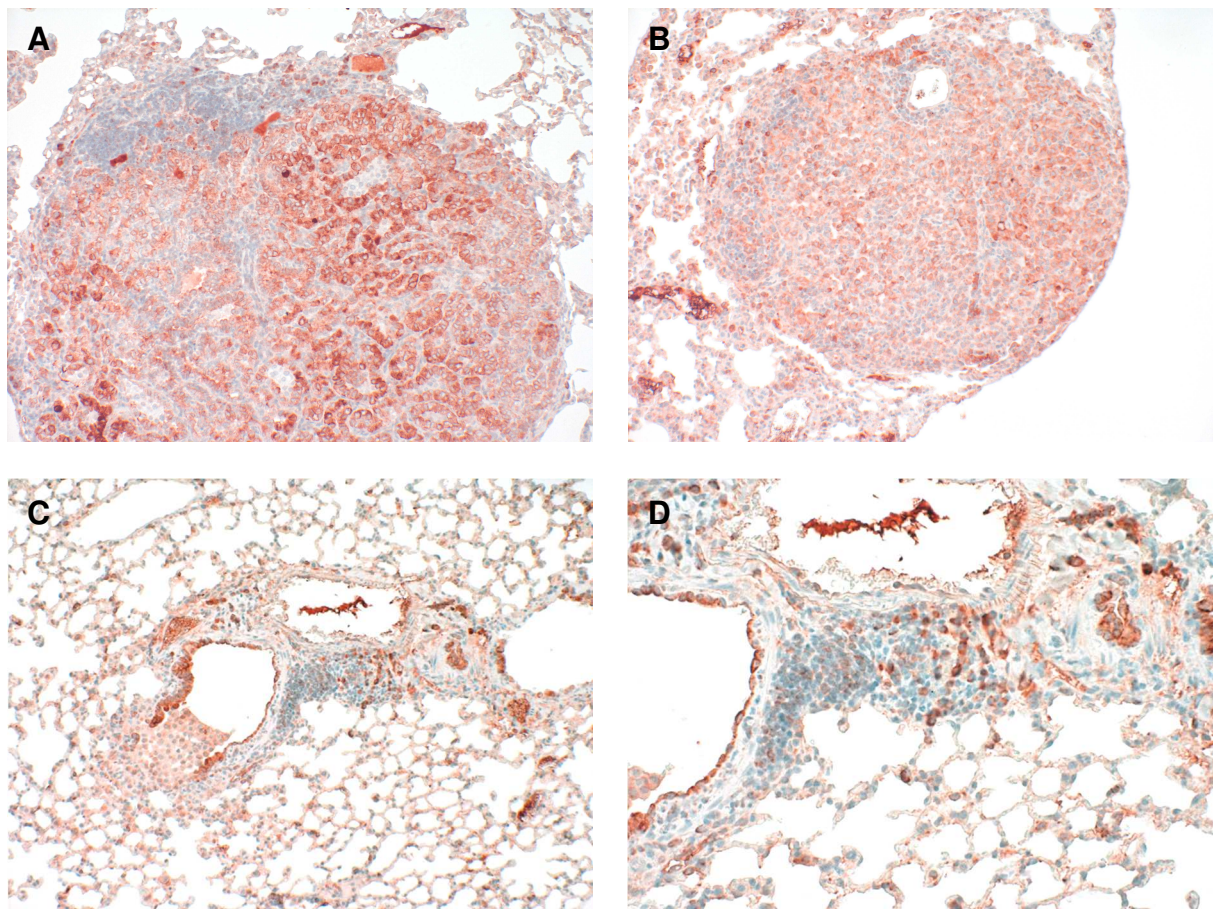


Abbildung 9: CXCL12/SDF-1-Expression in Lungentumoren von mit NNK und LPS behandelten *Cxcr4-eGFP*-BAC-Mäusen. A, B: NSCLC. C, D: SCLC. Immunhistochemie (rotbraune Färbung, Gegenfärbung mit Hämatoxylin). Originalvergrößerung: 200fach (A-C), 400fach (D).

5.1.2.4 Expression von CD34

Das Oberflächenprotein CD34 konnte mithilfe der immunhistochemischen Färbung an Paraffinschnitten insbesondere auf den die Innenseite der Blutgefäße auskleidenden Endothelzellen der Lunge nachgewiesen werden. Im gesunden Normalgewebe erschienen die CD34-Positivitäten mit zytoplasmatischer und membranständiger Anfärbung vor allem in unmittelbarer Nähe zu Bronchien und Bronchiolen.

Nichtkleinzellige Lungentumoren zeigten wenige intratumoral gelegene, CD34-exprimierende Zellen mit bevorzugter Lokalisation in peripheren Tumorbereichen sowie in der Nähe von Blutgefäßen, Bronchien und Bronchiolen. Auffallend war hierbei die nahezu vollständige Kongruenz zur intratumoralen CXCR4-Expression (siehe Abbildungen 8 A und C, Seite 49, und Abbildungen 10 A und B). In den kleinzelligen Lungentumoren war eine CD34-Expression mehrheitlich nicht nachweisbar und wies keine Abhängigkeit von der Tumorgroße auf. Im Unterschied zu nichtkleinzelligen Tumoren konnte keine Übereinstimmung mit der intratumoralen CXCR4-Expression gezeigt werden (siehe Abbildungen 8 B und D, Seite 49, und Abbildungen 10 C und D).

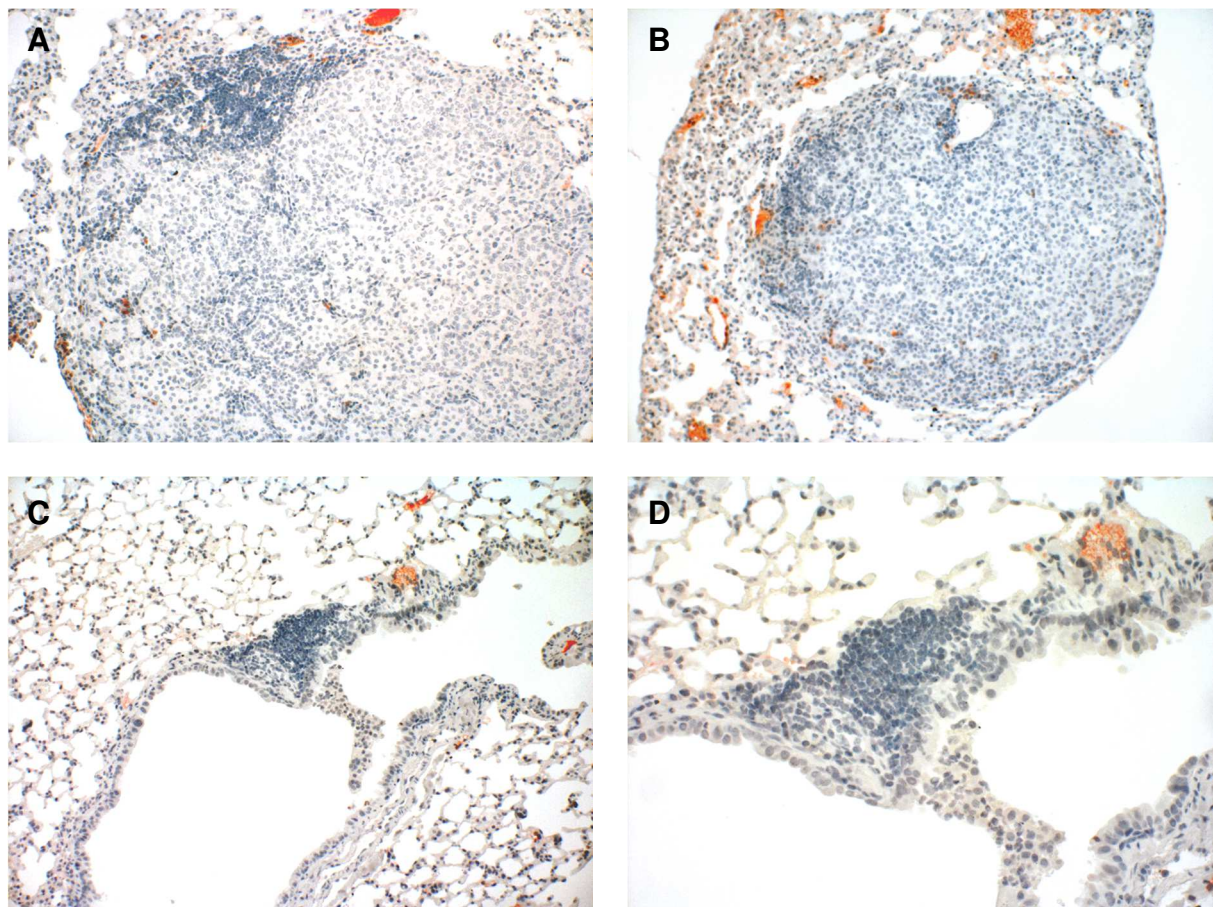


Abbildung 10: CD34-Expression in Lungentumoren von mit NNK und LPS behandelten *Cxcr4-eGFP*-BAC-Mäusen. A, B: NSCLC. C, D: SCLC. Immunhistochemie (rotbraune Färbung, Gegenfärbung mit Hämatoxylin). Originalvergrößerung: 200fach (A-C), 400fach (D).

5.1.2.5 Expression von Chromogranin A

Die immunhistochemische Chromogranin A-Färbung der Lungenpräparate ergab eine mäßige bis starke Expression in allen Tumorentitäten, mit jeweils inhomogenem Verteilungsmuster und einer im Vergleich zum umliegenden Normalgewebe stärkeren Anfärbung. Lediglich Bronchialepithelzellen und Zellen peripherer Lungenabschnitte zeigten im tumorfreien Normalgewebe vereinzelt Chromogranin A-Positivitäten.

Die Expression von Chromogranin A in nichtkleinzelligen Lungentumoren wies eine deutliche Variabilität auf. Hierbei konnte eine starke zytoplasmatische Anfärbung sowohl in peripher gelegenen, insbesondere dem Lungenrand anliegenden Tumorebenen, mitunter aber auch im gesamten Tumor nachgewiesen werden. Kleinzellige Bronchialkarzinome wiesen abhängig von deren Größe mehrheitlich ebenfalls eine starke zytoplasmatische Anfärbung von intratumoralen Zellen auf, allerdings ohne erkennbare spezielle Lokalisationsmuster im Tumor aufzuzeigen. In kleinzelligen Tumorzellansammlungen konnte lediglich der Nachweis einer mäßigen Expression von Chromogranin A erbracht werden. Die Abbildung 11 verdeutlicht diese Befunde.

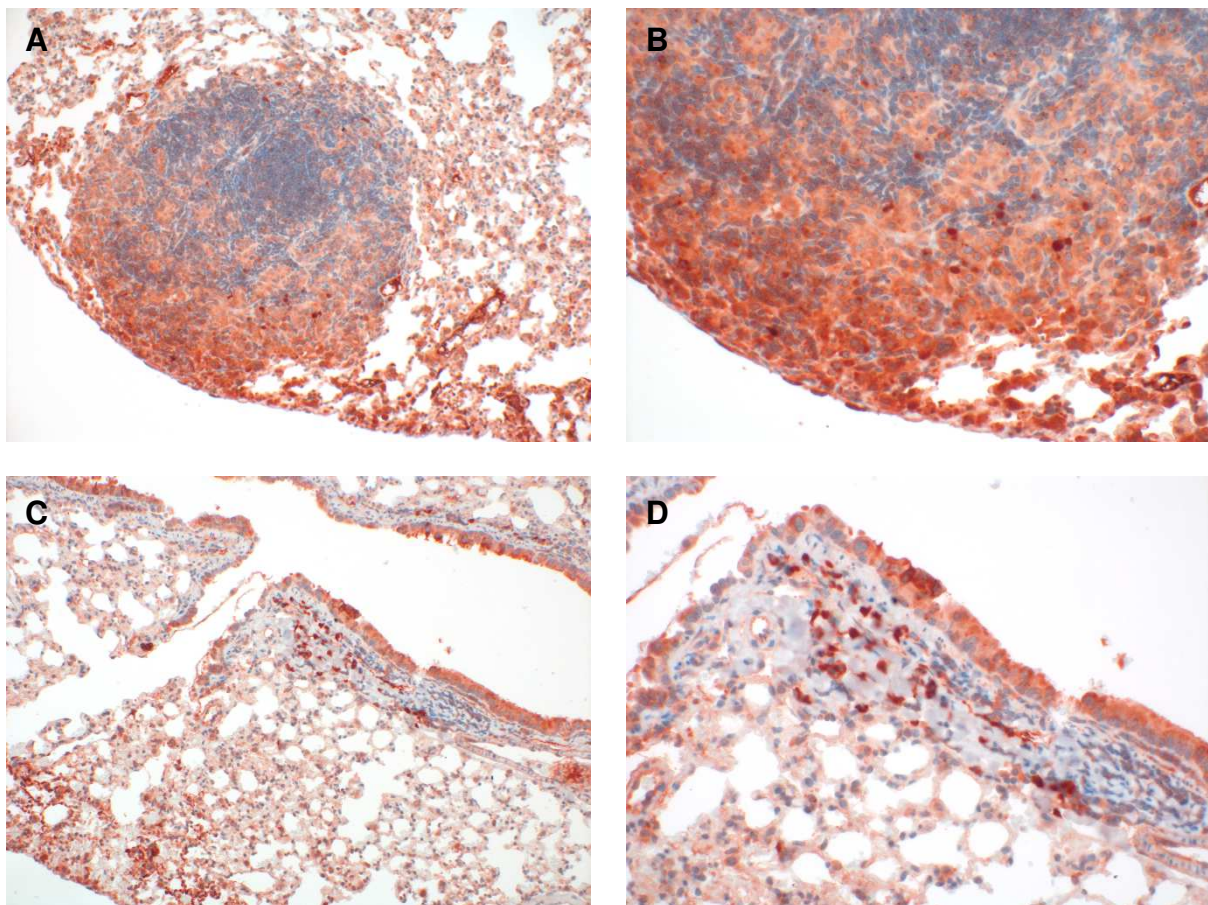


Abbildung 11: CgA-Expression in Lungentumoren von mit NNK und LPS behandelten *Cxcr4-eGFP-BAC*-Mäusen. A, B: NSCLC. C, D: SCLC. Immunhistochemie (rotbraune Färbung, Gegenfärbung mit Hämatoxylin). Originalvergrößerung: 200fach (A, C), 400fach (B, D).

5.1.2.6 Expression von Ki-67

Die Untersuchung des Proliferationsmarkers Ki-67 erbrachte den Nachweis Ki-67-positiver Zellen sowohl in den Tumorgeweben nichtkleinzelliger und kleinzelliger Lungentumoren als auch im Normalgewebe. Bei Bronchialepithel- und Alveolarepithelzellen, die zwar physiologischerweise einer erhöhten Teilungsaktivität unterliegen, konnte mehrheitlich keine Ki-67-Anfärbung der Zellkerne nachgewiesen werden.

Lungentumoren mit nichtkleinzelliger Differenzierung wiesen intratumoral überwiegend peripher gelegene, Ki-67-exprimierende Zellen mit einer Kernfärbung auf. Die mäßige zytoplasmatische Anfärbung peripherer Tumorbereiche ist als unspezifische Hintergrundfärbung anzusehen. Entsprechend einer höheren Proliferationsaktivität zeigten kleinzellige Bronchialkarzinome in Abhängigkeit von der Tumorgroße eine starke Ki-67-Expression mit deutlicher Anfärbung der Zellkerne. Mitunter fanden sich kleinzellige Tumorzellansammlungen ohne den Nachweis einer Expression des Proliferationsmarkers Ki-67. Die Verteilung der Ki-67-Expression ergab Ähnlichkeiten zur Expression von Chromogranin A (siehe Abbildung 11, Seite 52, und Abbildung 12).

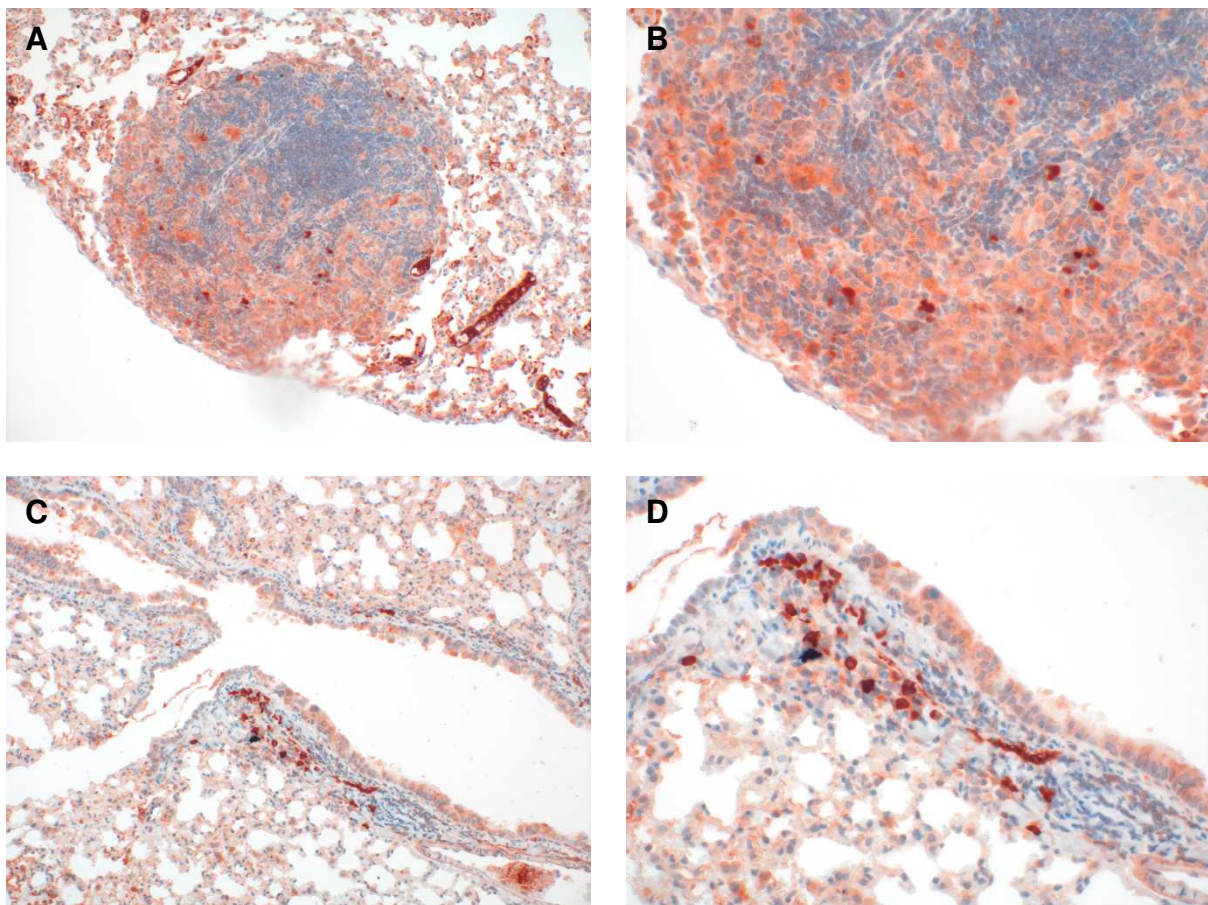


Abbildung 12: Ki-67-Expression in Lungentumoren von mit NNK und LPS behandelten *Cxcr4-eGFP-BAC*-Mäusen. A, B: NSCLC. C, D: SCLC. Immunhistochemie (rotbraune Färbung, Gegenfärbung mit Hämatoxylin). Originalvergrößerung: 200fach (A, C), 400fach (B, D).

5.1.2.7 Expression des SSTR2

Die immunhistochemische Darstellung des Somatostatin-Rezeptors SSTR2 ergab einen vereinzelt Nachweis SSTR2-positiver Zellen im tumorfreien Normalgewebe und in den Tumorgeweben. Vor allem in Bronchialepithelzellen konnten SSTR2-Positivitäten mit mäßiger, teils starker zytoplasmatischer Anfärbung nachgewiesen werden. In nichtkleinzelligen Lungentumorgeweben wiesen lediglich vereinzelte intratumoral gelegene Zellen eine schwache bis mäßige zytoplasmatische Anfärbung des Somatostatin-Rezeptors SSTR2 auf, wobei sich keine Unterschiede in Abhängigkeit von der Lage der Zellen im Tumor oder von der Tumorgroße zeigten (siehe Abbildung 13 A und B). Im Gegensatz hierzu konnte eine SSTR2-Expression in kleinzelligen Bronchialkarzinomen unabhängig von deren Größe nicht nachgewiesen werden (siehe Abbildung 13 C und D).

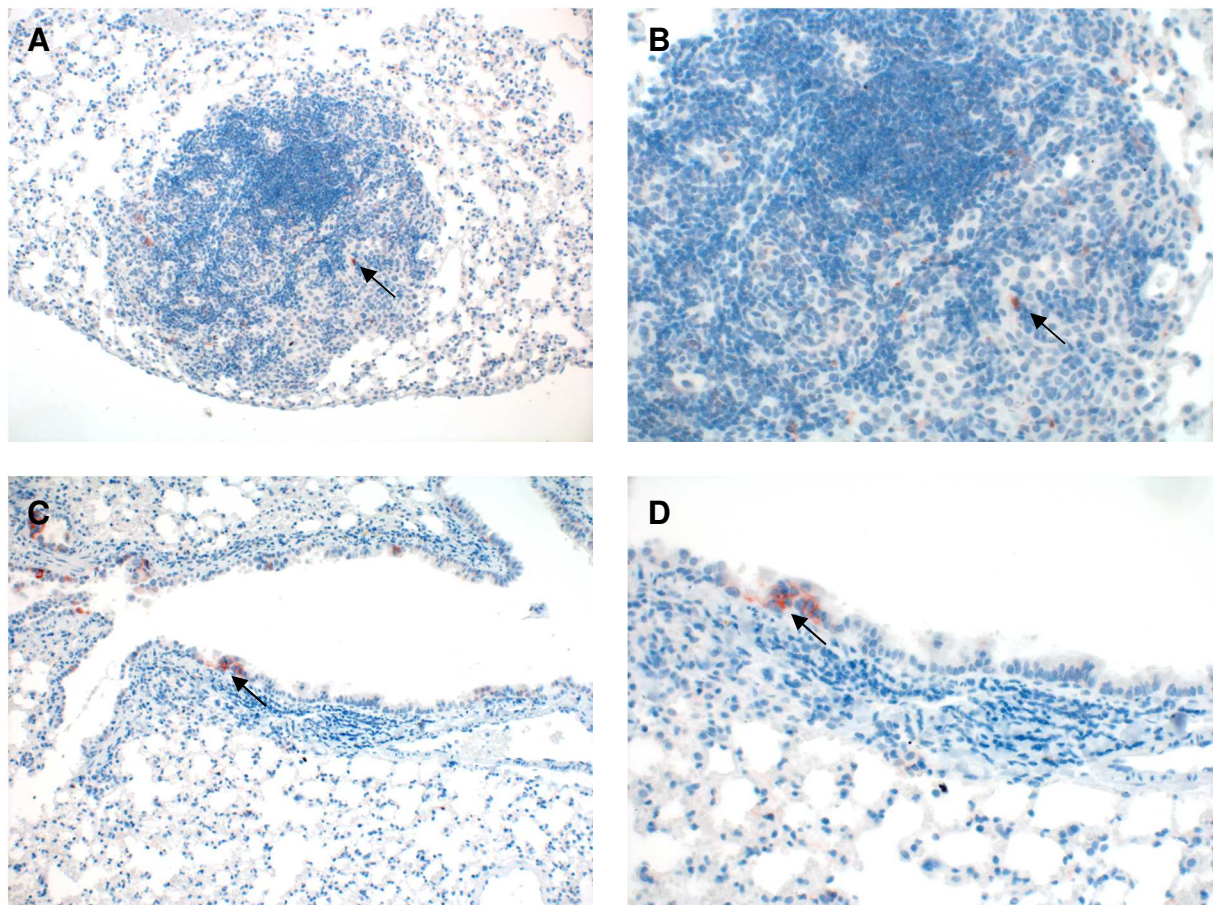


Abbildung 13: SSTR2-Expression in Lungentumoren von mit NNK und LPS behandelten *Cxcr4-eGFP*-BAC-Mäusen. A, B: NSCLC. C, D: SCLC. Die Pfeile deuten beispielhaft auf vereinzelte, intratumoral (A, B) und im Bereich des Bronchialepithels (C, D) gelegene SSTR2-positive Zellen. Immunhistochemie (rotbraune Färbung, Gegenfärbung mit Hämatoxylin). Originalvergrößerung: 200fach (A, C), 400fach (B, D).

5.1.3 Auswertung der Immunhistochemie an Free-Floating-Schnitten

5.1.3.1 Expression des CXCR4

Die Detektion des Chemokinrezeptors CXCR4 im Normalgewebe und im Tumorgewebe erfolgte sowohl mit dem phosphosensitiven Anti-CXCR4-Antikörper UMB-2 als auch mit dem unabhängig von der Rezeptorphosphorylierung bindenden Anti-CXCR4-Antikörper 2B11. Aufgrund der Phosphosensitivität des UMB-2 wurde die Anfärbung ohne und mit LPP-Behandlung durchgeführt. Abbildung 14 verdeutlicht den Einfluss der LPP-Behandlung beziehungsweise des zur Detektion des CXCR4 eingesetzten Antikörpers unter Darstellung repräsentativer Lungentumoren.

Mithilfe des Anti-CXCR4-Antikörpers UMB-2 gelang im tumorfreien Normalgewebe vereinzelt der Nachweis solitärer CXCR4-positiver Zellen, bei denen es sich am ehesten um CXCR4-exprimierende Immunzellen handelt. Insbesondere im Bereich des Bronchialepithels zeigten sich vermehrt Positivitäten. Im Tumorgewebe der nichtkleinzelligen Lungentumoren konnte mehrheitlich das Vorhandensein einer CXCR4-Expression nachgewiesen werden, die vor allem in Gefäßnähe und in peripher gelegenen Tumorarealen ausgeprägt war. Auch in kleinzelligen Lungentumoren wurde ein solches inhomogenes Expressionsmuster beobachtet. Den CXCR4-exprimierenden Zellen konnten jedoch keine bevorzugten Tumorareale zugeordnet werden.

Die Dephosphorylierung des Chemokinrezeptors durch die Vorbehandlung der Gewebeschnitte mit der LPP führte zu einer Intensitätszunahme des CXCR4-Immunsignals durch den UMB-2 im Normalgewebe und in den Tumorgeweben. Verglichen mit der immunhistochemischen Färbung an Paraffinschnitten war diese allerdings weniger stark ausgeprägt. Trotz fehlender Phosphosensitivität des Anti-CXCR4-Antikörpers 2B11 konnte lediglich eine grobe Übereinstimmung des CXCR4-Expressionsmusters im Vergleich zur Darstellung mithilfe des UMB-2 aufgezeigt werden. Sowohl bezüglich der Anzahl nachgewiesener intratumoraler CXCR4-Positivitäten, als auch der Intensität der Anfärbung ist der Anti-CXCR4-Antikörper 2B11 dem UMB-2 unterlegen.

Insgesamt konnten mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung bestätigt werden. Ebenso wurde die erwartungsgemäße Koexpression von CXCR4 und eGFP nachgewiesen, allerdings ohne eine vollständige Kongruenz aufzuzeigen. Bei beiden Methoden zeigte sich eine höhere Anzahl eGFP-exprimierender Zellen bei insgesamt geringerer Intensität der CXCR4-Expression.

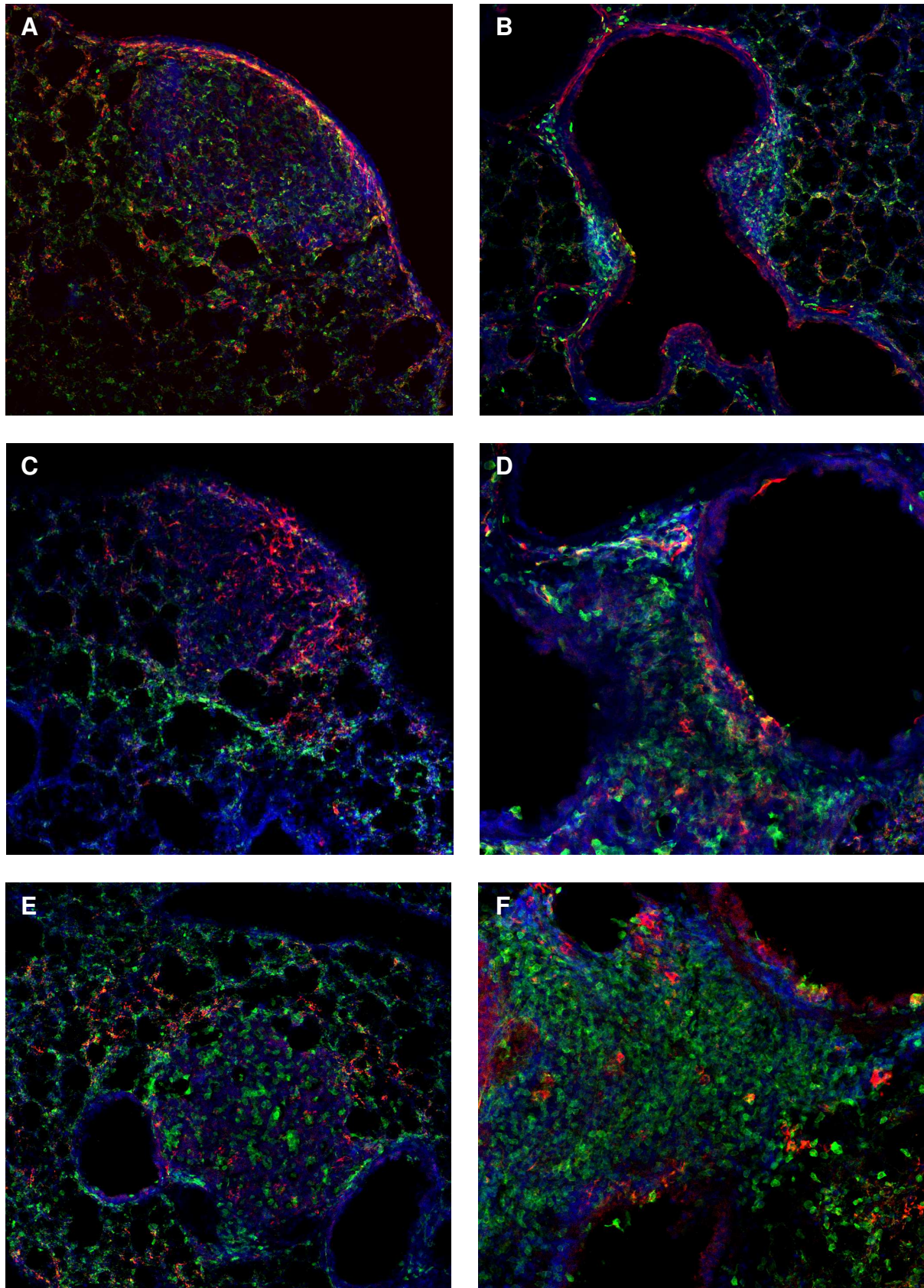


Abbildung 14: Nachweis der CXCR4-Expression unter Verwendung des Antikörpers UMB-2 ohne LPP-Behandlung (A, B), mit LPP-Behandlung (C, D) und des Antikörpers 2B11 (E, F) in Lungentumoren von mit NNK und LPS behandelten *Cxcr4-eGFP*-BAC-Mäusen. A, C, E: NSCLC. B, D, F: SCLC. Fluoreszenzmikroskopie (rot: CXCR4, grün: eGFP, blau: DAPI). Originalvergrößerung: 100fach (A, B, C, E), 200fach (D, F).

5.1.3.2 Expression von eGFP

Die Detektion des grün fluoreszierenden Proteins im Normal- und im Tumorgewebe erfolgte mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie in der *Cxcr4-eGFP*-BAC-Mauslinie einerseits unter Nachweis der Autofluoreszenz des in diesen Mäusen physiologischerweise exprimierten eGFP, andererseits durch Verwendung eines spezifischen gegen eGFP gerichteten Anti-eGFP-Antikörpers. Im tumorfreien Normalgewebe konnte in zahlreichen homogen verteilten Zellen eine eGFP-Expression mit zytoplasmatischer Anfärbung nachgewiesen werden, die vermutlich eGFP-exprimierenden Immunzellen zuzuordnen ist. Innerhalb des Bronchialepithels zeigten sich nur vereinzelt eGFP-Positivitäten. Nichtkleinzellige Lungentumoren wiesen vor allem in peripheren Tumorebenen eGFP-exprimierende Zellen auf. Kleinzellige Bronchialkarzinome erschienen ebenfalls deutlich eGFP-positiv, wobei mit zunehmender Tumorgroße ein Signalanstieg verzeichnet wurde. Charakteristisch war die hohe Dichte des eGFP-Signals aufgrund der räumlichen Überlagerung der sehr kleinen Tumorzellen. Den Tumorentitäten gemeinsam war das inhomogene Verteilungsmuster intratumoraler eGFP-positiver Zellen mit zytoplasmatischer Lokalisation der Positivitäten.

5.1.3.3 Expression von CXCL12/SDF-1

Die Expression des Chemokins CXCL12/SDF-1 wurde mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie sowohl im gesunden Lungengewebe als auch in nichtkleinzelligen und kleinzelligen Lungentumoren detektiert. CXCL12/SDF-1 wird physiologischerweise von Zellen des Bindegewebes und des Endothels exprimiert. Im Normalgewebe ergaben sich hierdurch Positivitäten unter Abzeichnung des Bronchialepithels und der Alveolarsepten mit homogenem Verteilungsmuster.

In nichtkleinzelligen Lungentumoren konnten vor allem in peripheren, dem Normalgewebe anliegenden Tumorbereichen inhomogen verteilte CXCL12/SDF-1-exprimierende Zellen festgestellt werden. Mitunter wurden solitäre Positivitäten aufgezeigt. Kleinzellige Bronchialkarzinome wiesen intratumoral allenfalls vereinzelt CXCL12/SDF-1-exprimierende Zellen auf, wobei kein charakteristisches Expressionsmuster nachzuweisen war. Im Ausmaß der intratumoralen Expression des CXCL12/SDF-1 bestand keine Abhängigkeit zur Tumorgroße. Die Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie hinsichtlich des CXCL12/SDF-1-Expressionsmusters entsprechen denen der immunhistochemischen Färbung an Paraffinschnitten. In der nachfolgenden Abbildung 15 ist die Expression des CXCL12/SDF-1 in repräsentativen nichtklein-

zelligen und kleinzelligen Lungentumoren veranschaulicht. Weiterhin sind in Abbildung 15 B im Bereich des Bronchialepithels auffallende Positivitäten zu erkennen. Eine Koexpression von CXCL12/SDF-1 und eGFP konnte nicht festgestellt werden.

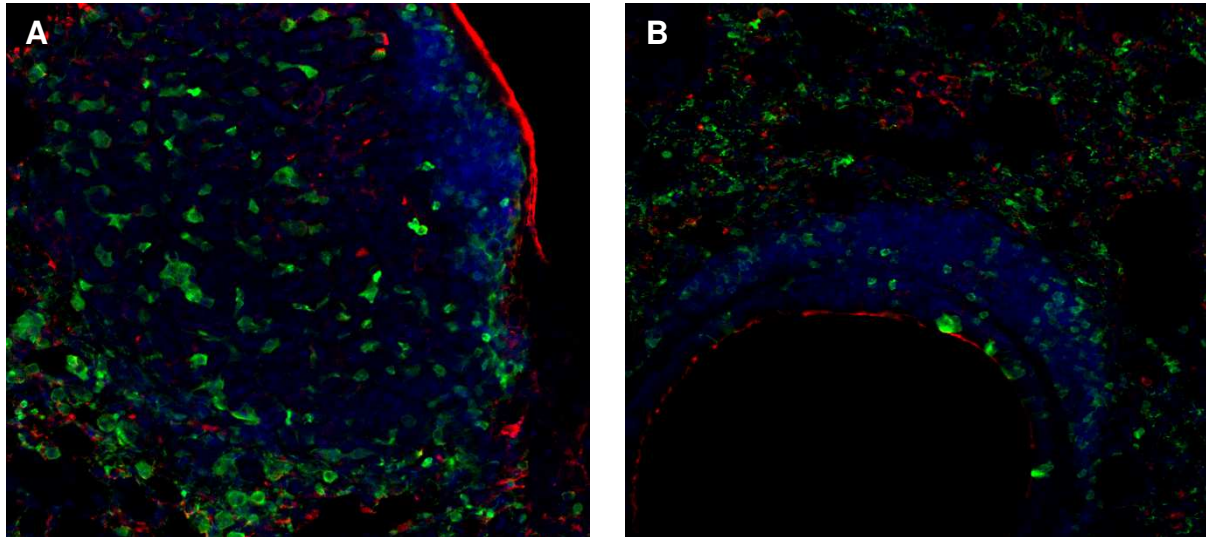


Abbildung 15: CXCL12/SDF-1-Expression in Lungentumoren von mit NNK und LPS behandelten *Cxcr4-eGFP*-BAC-Mäusen. A: NSCLC. B: SCLC. Fluoreszenzmikroskopie (rot: CXCL12/SDF-1, grün: eGFP, blau: DAPI). Originalvergrößerung: 200fach (A, B).

5.1.3.4 Expression ausgewählter Immunzellmarker

Die weitere Charakterisierung der CXCR4-exprimierenden Immunzellen erfolgte mithilfe der Anfärbung ausgewählter Immunzellmarker. Die Darstellung der Expression von CD11b, CD31, CD68 und Gr-1 ermöglicht hierbei die Unterscheidung zwischen CXCR4-positiven Tumorzellen und verschiedenen Leukozytenpopulationen.

Das Oberflächenprotein CD11b wird physiologischerweise auf der Oberfläche von Leukozyten, insbesondere von Monozyten, Granulozyten, Makrophagen und NK-Zellen, exprimiert. Erwartungsgemäß gelang der Nachweis des CD11b mehrheitlich in verstreut im Normalgewebe liegenden Zellen mit homogenem Verteilungsmuster. Im Bereich des Bronchialepithels und in unmittelbarer Nähe von Bronchien und von Bronchiolen konnte eine erhöhte Konzentration CD11b-positiver Zellen festgestellt werden. Auffallend war die deutliche Koexpression von CD11b und eGFP, wie aus der nachstehenden Abbildung 16 A, Seite 60, ersichtlich ist. Im Gegensatz hierzu zeigten Lungentumoren unabhängig von deren Größe und deren Entität eine deutlich geringere CD11b-Expression als das Normalgewebe. Es fanden sich lediglich vereinzelte, mitunter in Gruppen zusammenliegende Zellen, wobei es sich höchstwahrscheinlich um intratumoral gelegene CD11b-exprimierende Leukozyten handelt.

Endothelzellen sowie unter anderem auch neutrophile Granulozyten und Makrophagen exprimieren das Transmembranprotein CD31. Die Darstellung dieses Oberflächenmarkers erbrachte die nahezu vollständige Anfärbung des gesunden Lungengewebes mit deutlicher Abzeichnung von Alveolarsepten und von Bronchien. Diese Positivitäten entsprechen überwiegend CD31-exprimierenden Endothelzellen und Immunzellen. Ähnlich der CD11b-Darstellung konnten CD31-positive Zellen in den Tumorgeweben unabhängig von deren Entität und Größe lediglich vereinzelt nachgewiesen werden. Diese stellen am ehesten intratumoral gelegene, CD31-exprimierende Immunzellen oder von Tumorgewebe umschlossene Blutgefäße dar (siehe Abbildung 16 C, Seite 60).

Das Oberflächenprotein CD68 erscheint vor allem in den zytoplasmatischen Granula von Makrophagen. Der Nachweis CD68-positiver Zellen konnte im gesamten Normalgewebe unter deutlicher Abzeichnung des Bronchialepithels erreicht werden. Den Erwartungen entsprechend bestand eine sichtbare Ähnlichkeit zum Expressionsmuster des CD11b, das ebenfalls von Makrophagen exprimiert wird. Die Aussparung der Gewebe nichtkleinzelliger und kleinzelliger Lungentumoren ähnelt unabhängig von deren Größe dem Expressionsmuster des CD11b und des CD31. Vereinzelte, innerhalb der Tumorgewebe gelegene CD68-Positivitäten sind mit hoher Wahrscheinlichkeit auf das intratumorale Vorhandensein von Makrophagen zurückzuführen.

Der Nachweis des Oberflächenproteins Gr-1 als Marker für neutrophile Granulozyten wurde mit homogener Verteilung ebenfalls insbesondere im gesunden Lungengewebe erbracht. Im Unterschied zur Expression von CD11b und CD68 konnte keine bevorzugte Lokalisation im Bereich des Bronchialepithels festgestellt werden. Die Lungentumoren zeigten unabhängig von der Tumorentität und der Tumorgroße sehr unterschiedliche Expressionsmuster. Es wurden sowohl Lungentumoren mit homogener, als auch mit inhomogener Verteilung von Gr-1-Positivitäten dargestellt. Es fanden sich ebenso Bronchialkarzinome ohne eine Gr-1-Expression. Die nachstehenden Abbildungen 16 E und F veranschaulichen diese Befunde anhand eines kleinzelligen Bronchialkarzinoms ohne intratumoralen Gr-1-Nachweis und eines nichtkleinzelligen Lungentumors mit homogener Gr-1-Expression im gesamten Tumorbereich unter Aufzeigen einer deutlichen Koexpression mit eGFP.

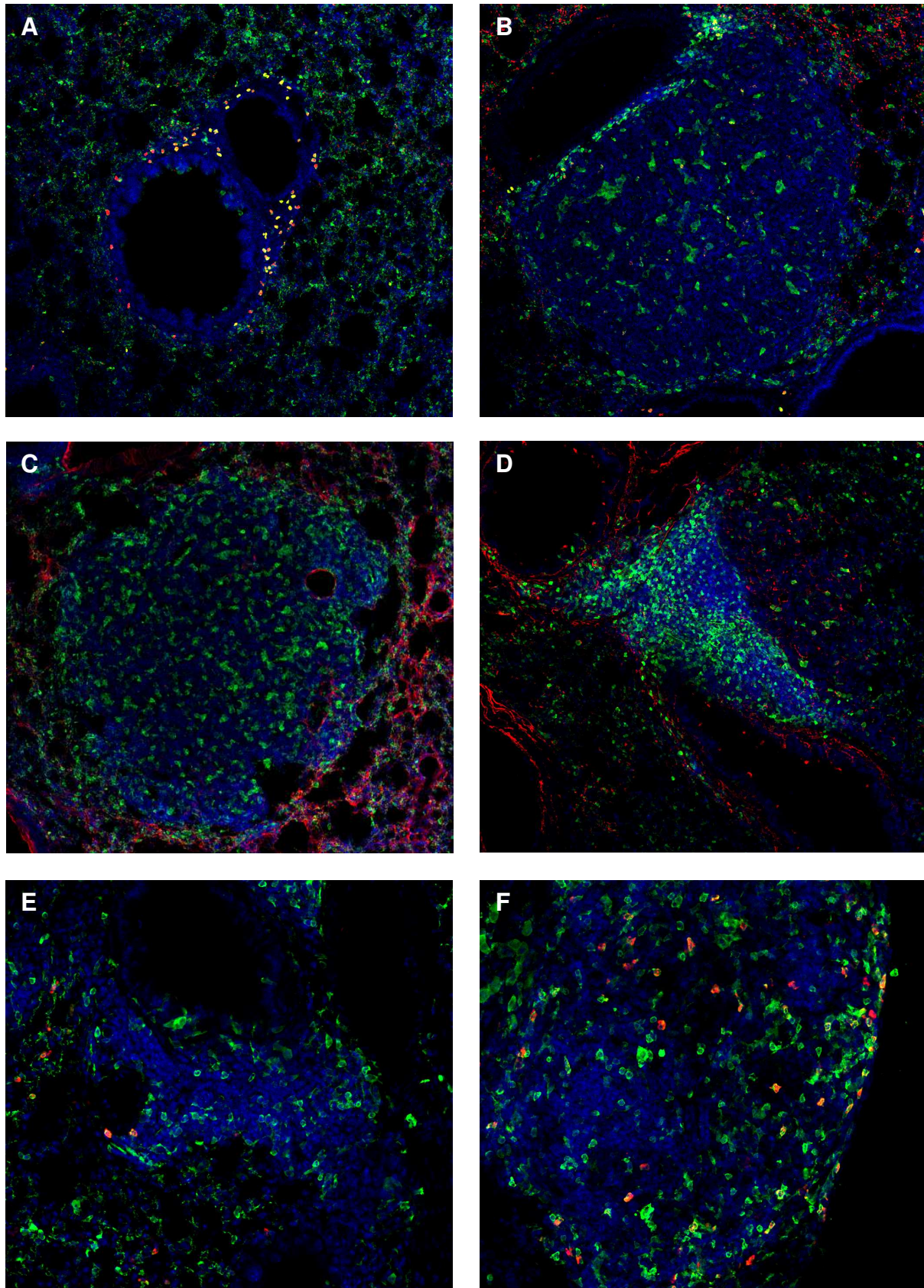


Abbildung 16: Expression von CD11b (A, B), CD31 (C), CD68 (D) und Gr-1 (E, F) in Lungentumoren von mit NNK und LPS behandelten *Cxcr4-eGFP*-BAC-Mäusen. A: Normalgewebe. B, C, F: NSCLC. D, E: SCLC. Fluoreszenzmikroskopie (rot: CD11b, CD31, CD68, Gr-1, grün: eGFP, blau: DAPI). Originalvergrößerung: 100fach (A-D), 200fach (E, F).

5.1.3.5 Expression von CD34

Mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie konnte das endotheliale Oberflächenprotein CD34 sowohl im gesunden Lungengewebe, als auch in den Tumorgeweben nicht-kleinzelliger und kleinzelliger Lungentumoren nachgewiesen werden. Entsprechend der physiologischen Expression durch Gefäßendothelzellen wurden im Normalgewebe demnach insbesondere in der Nähe von Bronchien, Bronchiolen sowie in unmittelbarer Tumorumgebung CD34-exprimierende Zellen festgestellt.

Nichtkleinzellige Lungentumoren ließen im gesamten Tumorbereich CD34-positive Zellen mit inhomogenem Verteilungsmuster erkennen, die am ehesten intratumoral gelegene Blutgefäße darstellen. Kleinzellige Bronchialkarzinome wiesen nahezu keine intratumoralen Positivitäten auf und zeigten hingegen in tumornahen Normalgewebsbereichen eine verstärkte CD34-Expression. Unabhängig von der Tumorentität war keine direkte Abhängigkeit zur Tumorgroße zu erkennen.

Die Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie stimmen mit denen der immunhistochemischen Färbung an Paraffinschnitten überein. Die Abbildung 17 zeigt die CD34-Positivitäten eines nichtkleinzelligen und eines kleinzelligen Lungentumors. Neben der Darstellung eines Gefäßquerschnitts mit endothelialer CD34-Expression innerhalb des nichtkleinzelligen Lungentumors in Abbildung 17 A ist auch die deutliche Anfärbung des subepithelialen Bindegewebes in Abbildung 17 B ersichtlich. Eine Koexpression von CD34 und eGFP wurde nicht festgestellt.

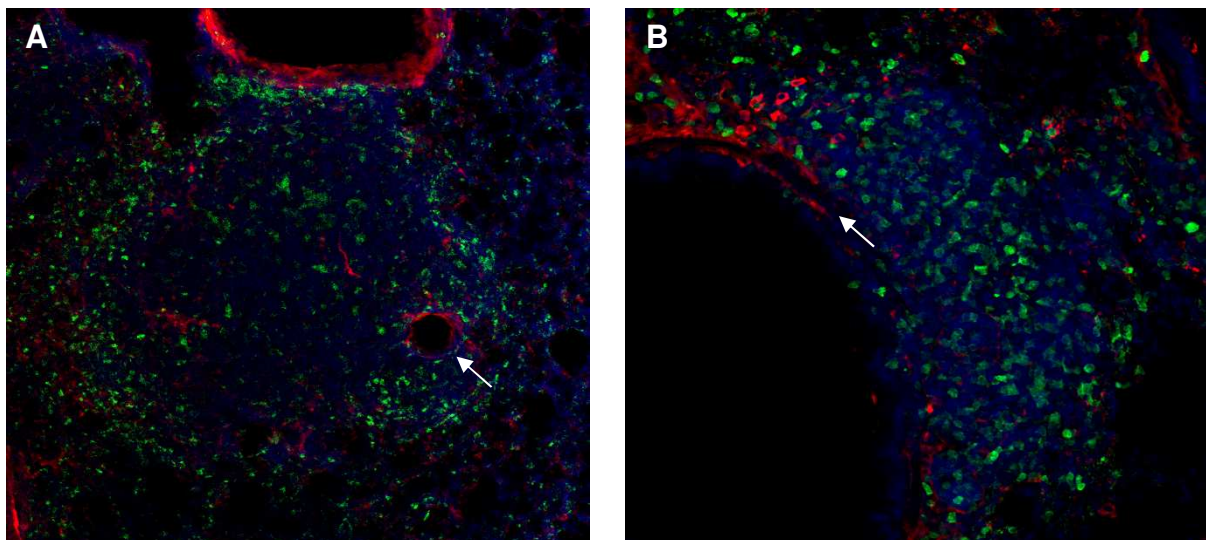


Abbildung 17: CD34-Expression in Lungentumoren von mit NNK und LPS behandelten *Cxcr4-eGFP*-BAC-Mäusen. A: NSCLC. B: SCLC. Die Pfeile deuten auf die CD34-exprimierenden Zellen eines Gefäßquerschnitts (A) und des subepithelialen Bindegewebes (B). Fluoreszenzmikroskopie (rot: CD34, grün: eGFP, blau: DAPI). Originalvergrößerung: 100fach (A), 200fach (B).

5.1.3.6 Expression von Ki-67

Der Proliferationsmarker Ki-67 wurde im tumorfreien Lungengewebe ebenso wie im Tumorgewebe dargestellt. Trotz der physiologischerweise hohen Proliferationsaktivität von Bronchialepithelzellen und Alveolarepithelzellen konnte nur vereinzelt der Nachweis einer Ki-67-Expression erbracht werden. Diese Positivitäten waren vor allem im Bereich des Bronchialepithels auffindbar.

In nichtkleinzelligen Lungentumoren gelang die Detektion Ki-67-positiver Zellen mit inhomogenem Verteilungsmuster und auffallend unterschiedlichem Lokalisationsmuster. Einerseits konnten peripher gelegene Proliferationsfronten nachgewiesen werden, andererseits fanden sich Ki-67-Positivitäten im gesamten Tumorgewebe ohne bevorzugte Lokalisation. Tumorzellansammlungen und Bronchialkarzinome mit kleinzelliger Differenzierung zeigten entsprechend ihrer Proliferationsaktivität mehrheitlich eine deutliche Expression von Ki-67 mit ebenfalls inhomogenem Verteilungsmuster. Weiterhin konnte eine Zunahme der Ki-67-Expression mit der Tumorgroße festgestellt werden. In Abbildung 18 sind repräsentative Tumorbereiche nichtkleinzelliger und kleinzelliger Lungentumoren dargestellt, wobei mitunter auch der Nachweis einer Koexpression von Ki-67 und eGFP gelang. Die Darstellung der Ki-67-Expression mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie bestätigt die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung an den Paraffinschnitten.

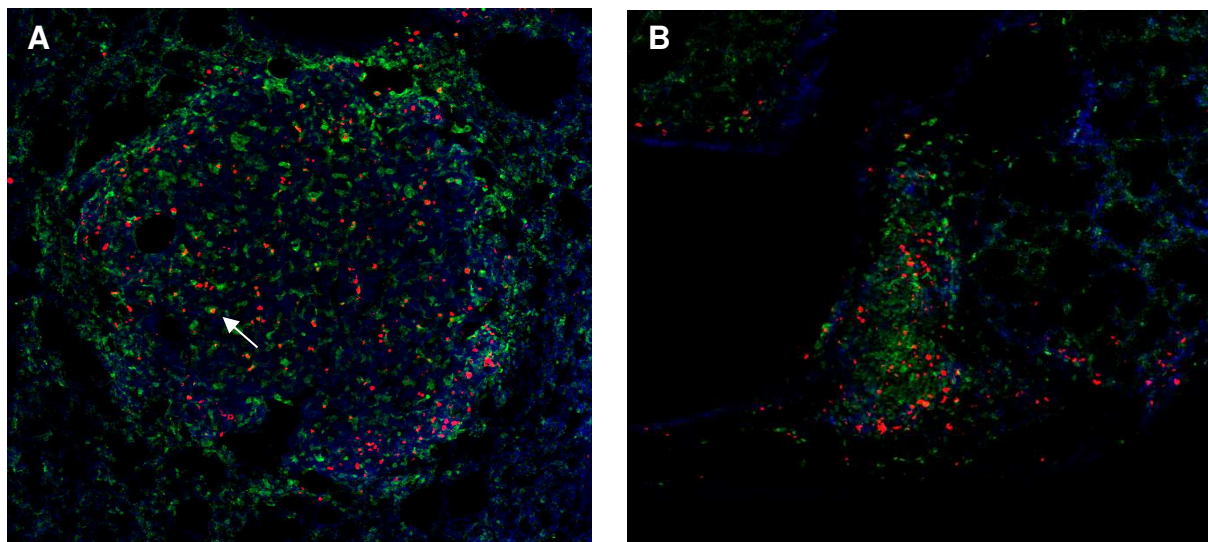


Abbildung 18: Ki-67-Expression in Lungentumoren von mit NNK und LPS behandelten *Cxcr4-eGFP-BAC*-Mäusen. A: NSCLC. B: SCLC. Der Pfeil deutet beispielhaft auf eine Koexpression von Ki-67 und eGFP. Fluoreszenzmikroskopie (rot: Ki-67, grün: eGFP, blau: DAPI). Originalvergrößerung: 100fach (A, B).

5.1.4 Auswertung der In-situ-Hybridisierung

Neben den immunhistochemischen Färbungen an Paraffinschnitten und mittels der Free-Floating-Methode als Antikörper-vermittelte Nachweisverfahren für Proteine dient die In-situ-Hybridisierung dem Nachweis von Nukleinsäuren. Die Lungengewebe wurden mit ^{35}S -markierten RNA-Sonden auf das Vorhandensein der *Cxcr4*-mRNA, der mRNA der *Cxcl12/SDF-1*-Isoformen *SDF-1 α* , *SDF-1 β* und *SDF-1 γ* sowie der Isoformen-übergreifenden *Cxcl12/SDF-1*-mRNA untersucht. Zur gewebespezifischen Beurteilung der entsprechenden mRNA-Expression erfolgte der direkte Vergleich zu sequentiellen HE-gefärbten Präparaten. Da nichtkleinzellige Bronchialkarzinome mit der In-situ-Hybridisierung nicht detektiert werden konnten, beschränkt sich die Beurteilung der Expression auf kleinzellige Bronchialkarzinome. Aufgrund der erkennbaren, feingranulären Ablagerung von Silberpartikeln außerhalb der Gewebebereiche ist von einer schwachen Hintergrundmarkierung auszugehen.

Eine *Cxcr4*-mRNA-Expression konnte sowohl im gesunden Lungengewebe als auch in den Tumorgeweben kleinzelliger Bronchialkarzinome nachgewiesen werden. Im Normalgewebe konnten, insbesondere im Bereich des Bronchialepithels, feingranuläre Silberpartikel mit homogenem Verteilungsmuster aufgezeigt werden. Weiterhin gelang der deutliche Nachweis von grobgranulären Partikelansammlungen, die am ehesten CXCR4-exprimierenden Immunzellen, wie beispielsweise Alveolarmakrophagen, zuzuordnen sind. Im Bereich kleinzelliger Bronchialkarzinome zeigte sich die feingranuläre Silberakkumulation in einer höheren Konzentration als im umliegenden Normalgewebe. Hieraus ergibt sich eine sichtbare Abgrenzung zwischen Tumorgewebe und gesundem Lungengewebe, die eine intratumorale Bildung von *Cxcr4*-mRNA bestätigt. Der Unterschied zwischen der grobgranulären Darstellung der CXCR4-exprimierenden Immunzellen und den feingranulären Ablagerungen in kleinzelligen Tumorarealen stützt diese Annahme.

Der Nachweis der mRNA des Isoformen-übergreifenden *Cxcl12/SDF-1* und der Isoformen *SDF-1 α* , *SDF-1 β* und *SDF-1 γ* ergab unterschiedliche Expressionsmuster. Das gesunde Lungengewebe zeigte jeweils eine homogen verteilte, feingranuläre Silberakkumulation, wobei im Vergleich zur Expression der *SDF-1 α* -mRNA niedrigere Konzentrationen an *SDF-1 β* - und *SDF-1 γ* -mRNA festgestellt werden konnten. Die höchste Signalintensität wurde durch die Isoformen-übergreifende Darstellung der

Cxcl12/SDF-1-mRNA erreicht. Neben feingranulären Ablagerungen waren hierbei auch solitäre grobgranuläre Silberniederschläge mit inhomogenem Verteilungsmuster erkennbar. Diese ähneln der grobgranulären *Cxcr4*-mRNA-Expression. In kleinzelligen Tumorgeweben konnte die Expression der mRNA aller untersuchten SDF-1-Isoformen durch feingranuläre Ablagerungen mit homogener Verteilung ohne bevorzugte intra-tumorale Lokalisation aufgezeigt werden. Eine im Vergleich zum Normalgewebe höhere Konzentration wurde hierbei allerdings lediglich bei der Darstellung der Isoformen-übergreifenden *Cxcl12/SDF-1*-mRNA nachgewiesen. Die Expression der mRNA von *SDF-1 α* , *SDF-1 β* und *SDF-1 γ* ergab keine Konzentrationsunterschiede zwischen Tumorgeweben und Nichttumorgeweben.

Die Ergebnisse der In-situ-Hybridisierung stimmen im Wesentlichen mit denen der Immunfärbungen an Paraffinschnitten und an Free-Floating-Schnitten überein. Abbildung 19 verdeutlicht den gewebespezifischen Nachweis der *Cxcr4*-mRNA und der Isoformen-übergreifenden *CXCL12/SDF-1*-mRNA.

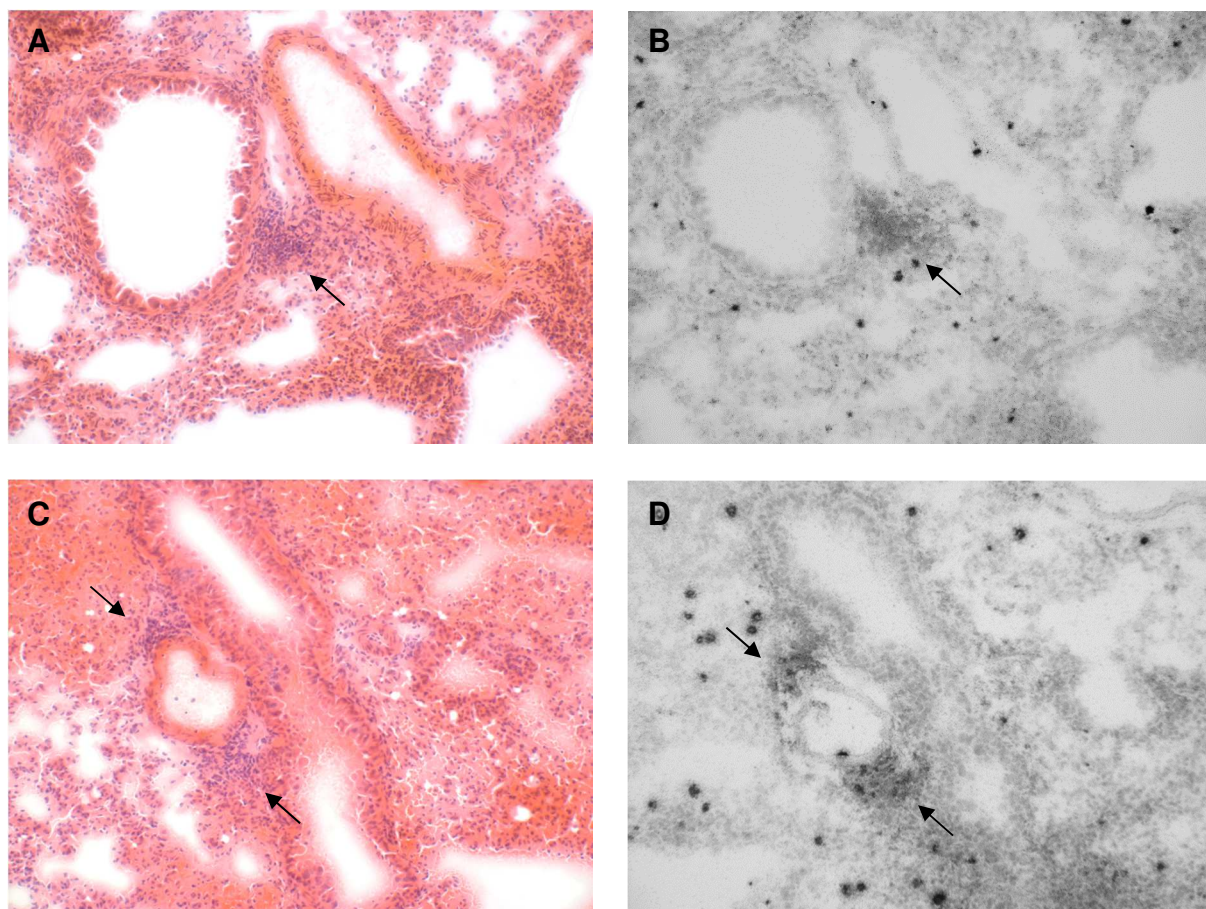


Abbildung 19: Gewebespezifischer Nachweis der *Cxcr4*-mRNA (B) und der *Cxcl12/SDF-1*-mRNA (D) in Lungentumoren von mit NNK und LPS behandelten *Cxcr4-eGFP*-BAC-Mäusen. A-D: SCLC. Die Pfeile deuten auf kleinzellige Tumoren. In-situ-Hybridisierung (schwarzer Niederschlag; B, D) und HE-Übersichtsfärbung (A, C). Originalvergrößerung: 200fach (A-D).

5.2 Pilotversuch zur Tumorinduktion mit LPS

Neben der Behandlung der *Cxcr4-eGFP*-BAC-Mäuse mit NNK und LPS erfolgte bei zwölf von insgesamt 24 Behandlungstieren ausschließlich die Gabe von LPS zur Erfassung einer möglichen LPS-induzierten Tumorbildung. Hierbei wurde bei der licht-mikroskopischen Auswertung der Lungenproben in einer mit LPS behandelten Maus ein Lungentumor mit kleinzelliger Differenzierung festgestellt, der in der Hämatoxylin-Eosin-Übersichtsfärbung und der immunhistochemischen Färbung des CXCR4 unter Verwendung des Anti-CXCR4-Antikörpers UMB-2 ohne und mit LPP-Behandlung und des CXCL12/SDF-1 dargestellt werden konnte (siehe Abbildung 21, Seite 66).

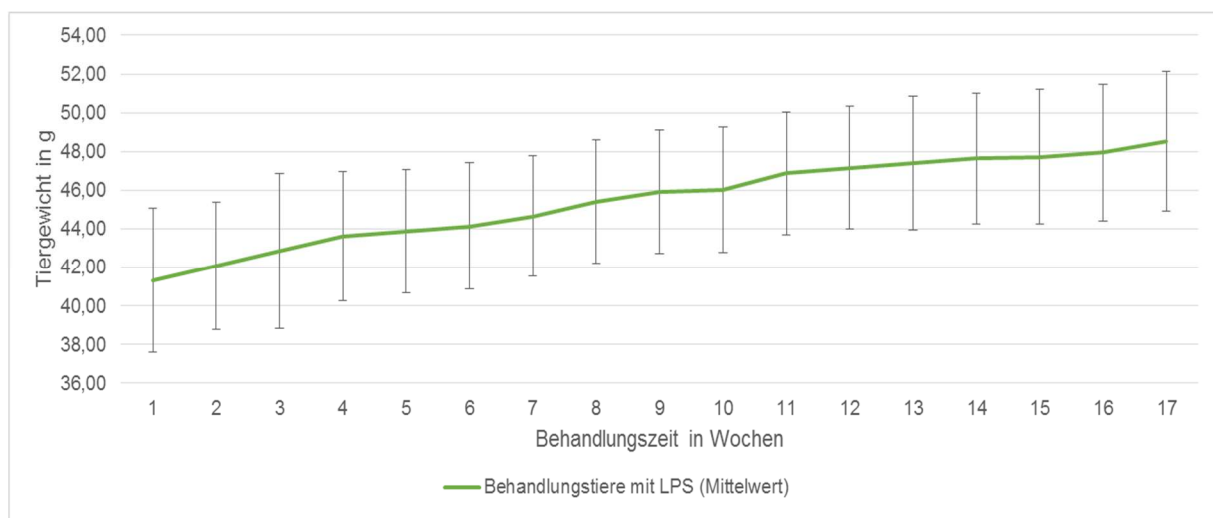


Abbildung 20: Entwicklung der Tiergewichte von nur mit LPS behandelten *Cxcr4-eGFP*-BAC-Mäusen (grün) während der 17-wöchigen Behandlungszeit. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD; n = 12 (Behandlungstiere mit LPS).

Als Nebenzielgröße wurden die Tiergewichte während des 17-wöchigen Untersuchungszeitraums einmal wöchentlich erfasst. In der Abbildung 20 ist die Tiergewichtsentwicklung unter Darstellung der jeweiligen Mittelwerte und der Standardabweichungen aufgezeigt. Das durchschnittliche Gewicht der Behandlungstiere betrug zu Beginn des Untersuchungszeitraums 41,34 g und lag somit circa 5 g über dem Durchschnittsgewicht der mit NNK und LPS behandelten Tiere und der Kontrolltiere des Pilotversuchs. Bis zum Ende der 17-wöchigen LPS-Behandlung konnte ein stetiger Gewichtsanstieg auf schließlich 49,15 g verzeichnet werden. Im Unterschied zu den mit NNK und LPS behandelten Mäusen zeigte sich keine Gewichtsreduktion innerhalb der ersten fünf Behandlungswochen. Die durchschnittliche Gewichtszunahme von circa 8 g in der Behandlungsgruppe mit LPS steht außerdem im Gegensatz

zur durchschnittlichen Gewichtszunahme von 2 g in der Behandlungsgruppe mit NNK und LPS beziehungsweise von etwa 6 g bei den unbehandelten Kontrolltieren.

In der nachstehenden Abbildung 21 ist das LPS-induzierte kleinzellige Bronchialkarzinom zu erkennen. Hierbei wurde der Nachweis intratumoral gelegener CXCR4-exprimierender Zellen mit inhomogenem Verteilungsmuster im gesamten Tumorgewebe erbracht. Aufgrund der Phosphosensitivität des Anti-CXCR4-Antikörpers UMB-2 konnte ein deutlicher Anstieg des Immunsignals nach LPP-Behandlung verzeichnet werden. Die Darstellung des Chemokins CXCL12/SDF-1 ergab vereinzelte, überwiegend in der Tumorpheripherie gelegene Positivitäten. Verglichen mit dem Normalgewebe ist die intratumorale Konzentration an CXCL12/SDF-1 erkennbar geringer. Die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung entsprechen denen der mit NNK und LPS behandelten *Cxcr4-eGFP*-BAC-Mäuse.

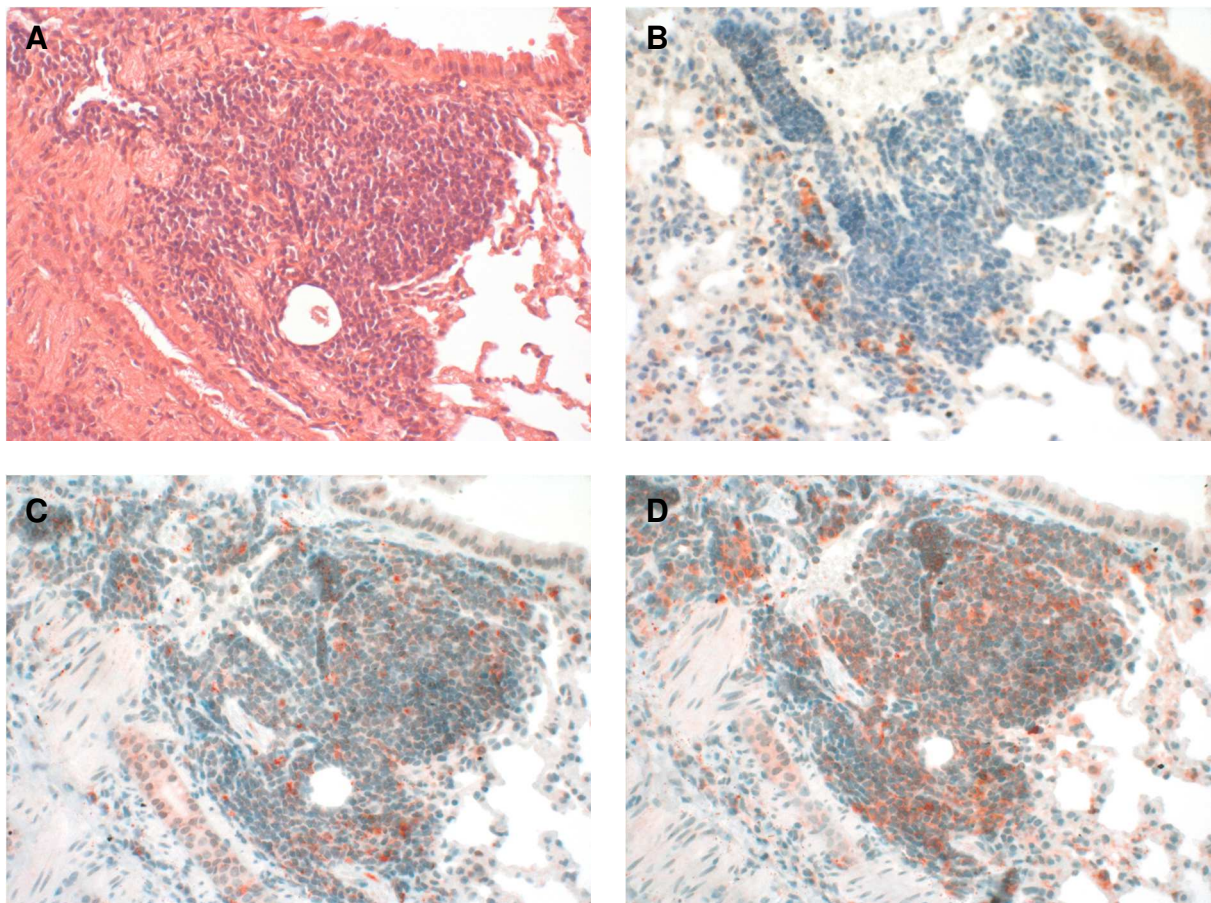


Abbildung 21: Hämatoxylin-Eosin-Übersichtsfärbung (A), CXCL12/SDF-1-Expression (B) und Nachweis der CXCR4-Expression unter Verwendung des Antikörpers UMB-2 ohne LPP-Behandlung (C) sowie mit LPP-Behandlung (D) in Lungentumoren von mit LPS behandelten *Cxcr4-eGFP*-BAC-Mäusen. A-D: SCLC. Hämatoxylin-Eosin-Übersichtsfärbung, Immunhistochemie (rotbraune Färbung, Gegenfärbung mit Hämatoxylin). Originalvergrößerung: 400fach (A-D).

5.3 Hauptversuch zur Erfassung der Wirkung von AMD3100

Nach analog zum Pilotversuch durchgeführter chemischer Induktion von Bronchialkarzinomen durch die Behandlung der *Cxcl12-Cxcl12RFP/Cxcr4-eGFP*-BAC-Mäuse mit NNK und LPS erfolgte bei drei von insgesamt zwölf Behandlungstieren über zwei Wochen die Gabe des nicht-peptidischen CXCR4-Antagonisten AMD3100. Anschließend wurde die histologische Aufarbeitung der Lungen zur Tumordetektion bei den zwölf Behandlungstieren und den vier gleichaltrigen Kontrolltieren vorgenommen. Der Nachweis der Expression des Chemokinrezeptors CXCR4 gelang wie bereits im Pilotversuch mithilfe des Anti-CXCR4-Antikörpers UMB-2 ohne und mit LPP-Behandlung der Gewebeschnitte. Darüber hinaus wurde die Expression weiterer Markerproteine zur genaueren Charakterisierung der CXCR4-positiven Zellen untersucht. Eine detaillierte Übersicht über die im Hauptversuch angewandten Untersuchungsmethoden und die analysierten Marker ist der Abbildung 22 zu entnehmen.

Hauptversuch Erfassung der Wirkung von AMD3100	
Histologie	Free-Floating-Methode
<ul style="list-style-type: none"> - HE-Übersichtsfärbung - Immunhistochemie <ul style="list-style-type: none"> • CD34 • Chromogranin A • CXCL12/SDF-1 • CXCR4 (UMB-2 ± LPP) • eGFP • Ki-67 • SSTR2 	<ul style="list-style-type: none"> - Fluoreszenzmikroskopie <ul style="list-style-type: none"> • CD11b • CD31 • CD34 • CD68 • CXCL12/SDF-1 • CXCR4 (UMB-2 ± LPP) • eGFP • Gr-1 • Ki-67

Abbildung 22: Übersicht über die im Hauptversuch angewandten Untersuchungsmethoden sowie die jeweils dargestellten Markerproteine.

Analog zum Pilotversuch erfolgte die Erfassung der Tiergewichte während des 19-wöchigen Untersuchungszeitraums als Nebenzielgröße. Aus der nachstehenden Abbildung 23 ist die Tiergewichtsentwicklung der mit NNK und LPS beziehungsweise mit NNK, LPS und AMD3100 behandelten Mäuse sowie der vier Kontrolltiere zu entnehmen. Dargestellt sind hierbei die Mittelwerte der Tiergewichte und die Standardabweichungen. Die Messung der Tiergewichte wurde einmal wöchentlich vorgenom-

men. Das durchschnittliche Mausgewicht zu Beginn des Untersuchungszeitraums betrug 35,19 g.

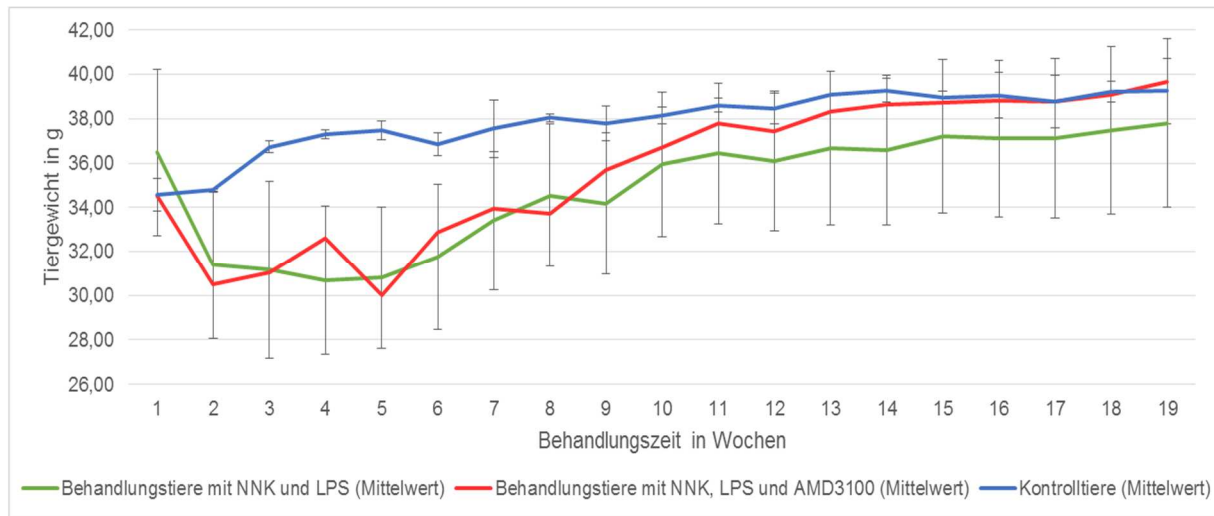


Abbildung 23: Entwicklung der Tiergewichte von mit NNK und LPS (grün) beziehungsweise mit NNK, LPS und AMD3100 (rot) behandelten *Cxcl12-Cxcl12RFP/Cxcr4-eGFP-BAC*-Mäusen während der 19-wöchigen Behandlungszeit sowie der Tiergewichte entsprechender Kontrolltiere ohne Behandlung mit NNK, LPS und AMD3100 (blau). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD; n = 9 (Behandlungstiere mit NNK und LPS), n = 3 (Behandlungstiere mit NNK, LPS und AMD3100), n = 4 (Kontrolltiere).

Die Kontrolltiere zeigten innerhalb des Untersuchungszeitraums einen Gewichtsanstieg auf durchschnittlich 38,46 g bis zur zwölften Untersuchungswoche mit anschließender Stagnation des durchschnittlichen Tiergewichts zwischen 38,50 g und 40,00 g. In den Behandlungsgruppen mit NNK und LPS beziehungsweise mit NNK, LPS und AMD3100 wurde unmittelbar nach Behandlungsbeginn eine Gewichtsreduktion auf durchschnittlich 30,41 g bis zur fünften Untersuchungswoche festgestellt. Das Anfangsgewicht konnte hierbei in den Behandlungsgruppen mit NNK und LPS beziehungsweise NNK, LPS und AMD3100 in der elften beziehungsweise neunten Untersuchungswoche wieder erreicht werden. Im weiteren Verlauf wurde ein stetiger Gewichtsanstieg verzeichnet, wobei die Mäuse der Behandlungsgruppe mit NNK, LPS und AMD3100 sogar wieder das Gewichtsniveau der Kontrolltiere erreichten. Am Ende des Untersuchungszeitraums in der 19. Behandlungswoche betrug das durchschnittliche Tiergewicht der Kontrolltiere 39,26 g, der mit NNK und LPS behandelten Tiere 37,80 g und der zusätzlich mit AMD3100 behandelten Tiere 39,68 g.

5.3.1 Mikroskopischer Tumornachweis

Der mikroskopische Nachweis der Lungentumorbildung erfolgte zunächst anhand einer Hämatoxylin-Eosin-Übersichtsfärbung. Hierbei konnten nichtkleinzellige und kleinzellige Lungentumoren in allen *Cxcl12-Cxcl12RFP/Cxcr4-eGFP-BAC*-Mäusen detektiert werden (siehe Abbildung 24). Die Lungentumorentwicklung zeigte keine Abhängigkeit vom angewandten Behandlungsschema, sodass in den Behandlungsgruppen mit NNK und LPS beziehungsweise mit NNK, LPS und AMD3100 gleichermaßen Lungentumoren mit einer charakteristischen nichtkleinzelligen und kleinzelligen Morphologie festgestellt wurden. Lungentumoren mit nichtkleinzelliger Differenzierung fanden sich vor allem in peripheren Lungenabschnitten. Kleinzellige Bronchialkarzinome mit einem deutlich ungeordneten Wachstumsmuster und unscharfer Abgrenzung zum umliegenden Nichttumorgewebe erschienen in zentralen, den Bronchien und Bronchiolen anliegenden Bereichen. Zudem wurden einige wenige Tumoren mit Anteilen beider Entitäten nachgewiesen.

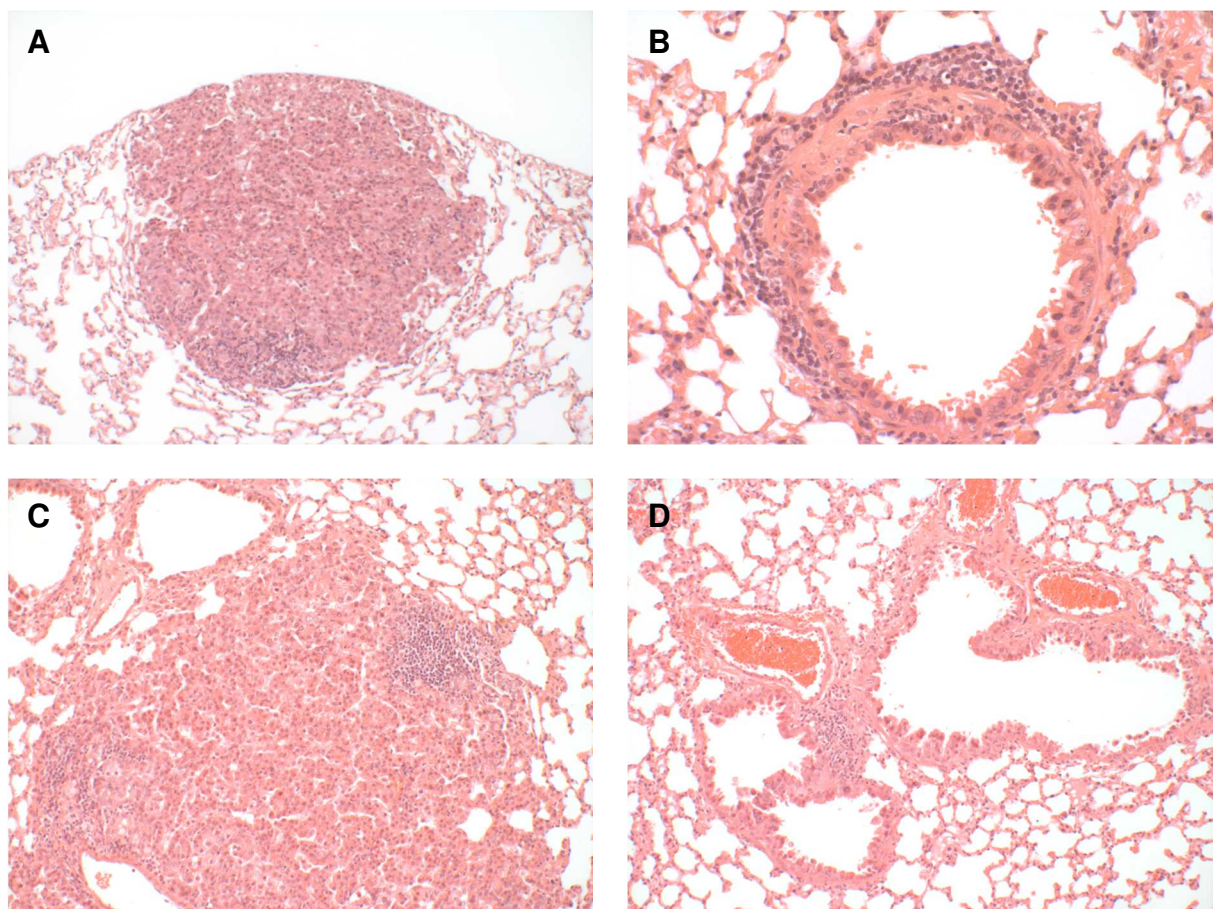


Abbildung 24: Mikroskopische Darstellung der Lungentumoren von mit NNK und LPS (A, B) beziehungsweise mit NNK, LPS und AMD3100 (C, D) behandelten *Cxcl12-Cxcl12RFP/Cxcr4-eGFP-BAC*-Mäusen. A, C: NSCLC. B, D: SCLC. Hämatoxylin-Eosin-Übersichtsfärbung. Originalvergrößerung: 200fach (A, C, D), 400fach (B).

5.3.2 Auswertung der Immunhistochemie an Paraffinschnitten

5.3.2.1 Expression des CXCR4

Das Vorhandensein CXCR4-exprimierender Zellen konnte sowohl im tumorfreien Normalgewebe als auch in den Tumorgeweben nichtkleinzelliger und kleinzelliger Lungentumoren in beiden Behandlungsgruppen bestätigt werden. In Abhängigkeit vom durchgeführten Behandlungsschema ergaben sich aufgrund der bekannten Phosphosensitivität des Anti-CXCR4-Antikörpers UMB-2 deutliche Unterschiede in der Expression des CXCR4 nach der Behandlung der Gewebeschnitte mit LPP. Wie auch im Pilotversuch konnte in der Behandlungsgruppe mit NNK und LPS nach der LPP-Behandlung eine generelle Verstärkung des bereits ohne LPP aufgezeigten CXCR4-Expressionsmodells im gesunden Lungengewebe und in den Tumorgeweben nachgewiesen werden. In der Behandlungsgruppe mit NNK, LPS und AMD3100 zeigten sich hingegen weder im gesunden Lungengewebe, noch in den Tumorgeweben bedeutende Unterschiede in der CXCR4-Expression zwischen den Schnitten ohne und mit LPP-Behandlung (siehe Abbildung 25, Seite 71).

Im tumorfreien Normalgewebe wurden insbesondere im Interstitium und im Bereich des Bronchialepithels homogen verteilte CXCR4-exprimierende Zellen nachgewiesen, die am ehesten Immunzellen wie Alveolarmakrophagen, Monozyten und neutrophile Granulozyten darstellen. Nichtkleinzellige Lungentumoren wiesen vor allem in peripher gelegenen und gefäßnahen Tumorarealen vereinzelt mäßige CXCR4-Positivitäten auf. Mitunter zeigten sich Mischtumoren mit abgrenzbaren CXCR4-positiven kleinzelligen Tumorbereichen. In kleinzelligen Tumoren gelang der Nachweis zahlreicher CXCR4-exprimierender Tumorzellen mit starker Anfärbung im gesamten Tumorareal. Unabhängig von der Tumorentität konnte ein inhomogenes Verteilungsmuster der CXCR4-positiven Zellen verzeichnet werden. Unterschiede resultierten in Abhängigkeit vom Behandlungsschema in der Rezeptorlokalisierung des CXCR4. Die Behandlungsgruppe mit NNK und LPS zeigte eine mehrheitlich zytoplasmatische Anfärbung, die in Bronchialkarzinomen mit kleinzelliger Differenzierung darüber hinaus mit zahlreichen, deutlich abgrenzbaren zytoplasmatischen Granula erschien. In der Behandlungsgruppe mit NNK, LPS und AMD3100 konnte im Gegensatz dazu eine überwiegend membranständige Lokalisation des CXCR4 festgestellt werden. Unterschiede in der subzellulären Lokalisation des CXCR4 zwischen der Behandlung mit und ohne LPP ergaben sich nicht. Die nachstehende Abbildung 25 verdeutlicht diese Befunde unter

Darstellung repräsentativer nichtkleinzelliger und kleinzelliger Lungentumoren beider Behandlungsgruppen.

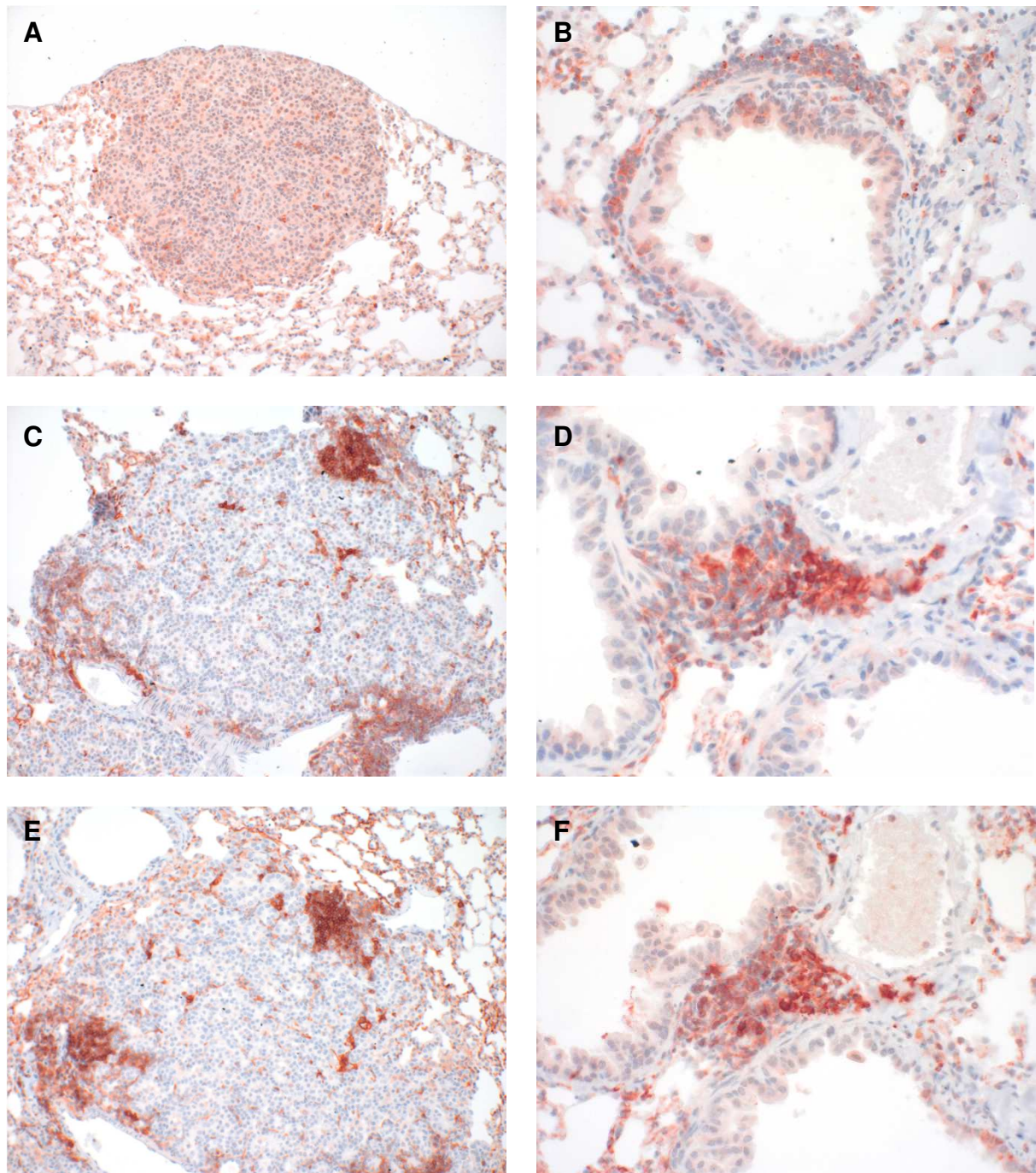


Abbildung 25: Nachweis der CXCR4-Expression unter Verwendung des Antikörpers UMB-2 ohne LPP-Behandlung (C, D) und mit LPP-Behandlung (A, B, E, F) in Lungentumoren von mit NNK und LPS (A, B) beziehungsweise mit NNK, LPS und AMD3100 (C, D, E, F) behandelten *Cxcl12-Cxcl12RFP/Cxcr4-eGFP*-BAC-Mäusen. A, C, E: NSCLC. B, D, F: SCLC. Immunhistochemie (rotbraune Färbung, Gegenfärbung mit Hämatoxylin). Originalvergrößerung: 200fach (A, C, E), 400fach (B, D, F).

5.3.2.2 Expression von eGFP

Der immunhistochemische Nachweis der Expression von eGFP ergab zytoplasmatische Positivitäten sowohl im Normalgewebe mit homogener Verteilung der eGFP-exprimierenden Zellen, als auch in den nichtkleinzelligen und kleinzelligen Lungentumoren mit inhomogenem Verteilungsmuster.

Nichtkleinzellige Tumoren zeigten insbesondere in peripheren, dem Normalgewebe anliegenden Tumorbereichen eGFP-positive Zellen mit mäßiger bis starker Anfärbung. In kleinzelligen Bronchialkarzinomen wurden im gesamten Tumorareal Positivitäten mit starker zytoplasmatischer Anfärbung nachgewiesen, ohne dabei ein bevorzugtes Lokalisationsmuster aufzuweisen. Ein Unterschied zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen mit NNK und LPS beziehungsweise mit NNK, LPS und AMD3100 ergab sich nicht. Entgegen den Ergebnissen des Pilotversuchs konnten keine deutlichen Unterschiede zwischen der CXCR4-Expression und der eGFP-Expression verzeichnet werden (siehe Abbildung 25, Seite 71, und Abbildung 26).

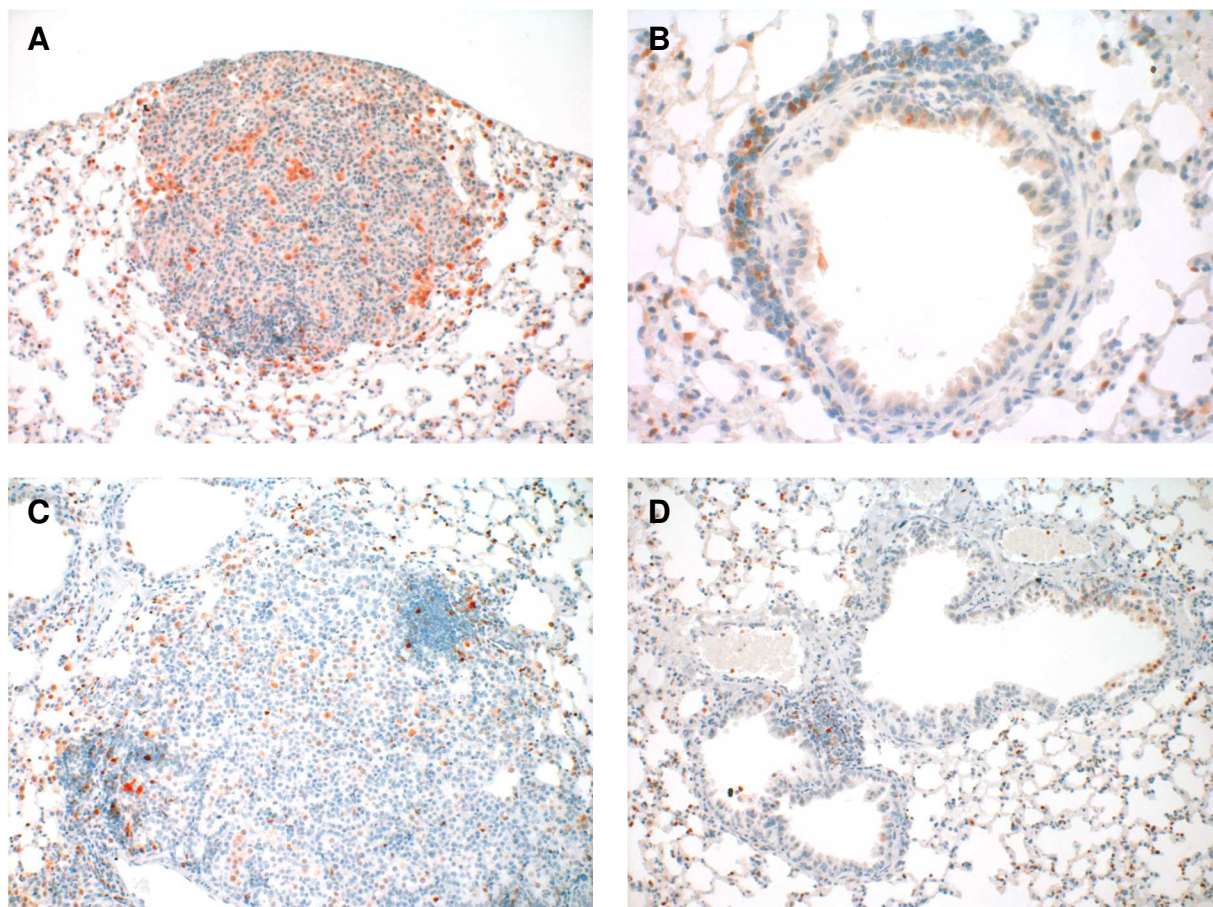


Abbildung 26: eGFP-Expression in Lungentumoren von mit NNK und LPS (A, B) beziehungsweise mit NNK, LPS und AMD3100 (C, D) behandelten *Cxcl12-Cxcl12RFP/Cxcr4-eGFP-BAC*-Mäusen. A, C: NSCLC. B, D: SCLC. Immunhistochemie (rotbraune Färbung, Gegenfärbung mit Hämatoxylin). Originalvergrößerung: 200fach (A, C, D), 400fach (B).

5.3.2.3 Expression von CXCL12/SDF-1

Der Nachweis des Chemokins CXCL12/SDF-1 konnte sowohl in den Tumorgeweben nichtkleinzelliger und kleinzelliger Lungentumoren als auch im Normalgewebe erbracht werden. Die mäßige Anfärbung von Bronchialepithelzellen verdeutlicht deren physiologische CXCL12/SDF-1-Expression. Dabei zeigte sich eine Abgrenzung zum übrigen Normalgewebe, das lediglich vereinzelt CXCL12/SDF-1-positive Zellen aufwies.

Mäßige CXCL12/SDF-1-Positivitäten konnten im gesamten Tumorbereich nichtkleinzelliger Lungentumorgewebe sowohl mit homogenem, als auch mit inhomogenem Verteilungsmuster nachgewiesen werden. Kleinzellige Tumoren zeigten nur vereinzelt peripher gelegene CXCL12/SDF-1-positive Zellen, wobei in den Tumorgeweben mehrheitlich keine CXCL12/SDF-1-Expression erkennbar war. Die Expression des CXCL12/SDF-1 zeigte keine Abhängigkeit vom Behandlungsschema. Wie bereits im Pilotversuch festzustellen war, zeichnete sich ein inverses Expressionsmuster des CXCL12/SDF-1 und des CXCR4 ab (siehe Abbildung 25, Seite 71, und Abbildung 27).

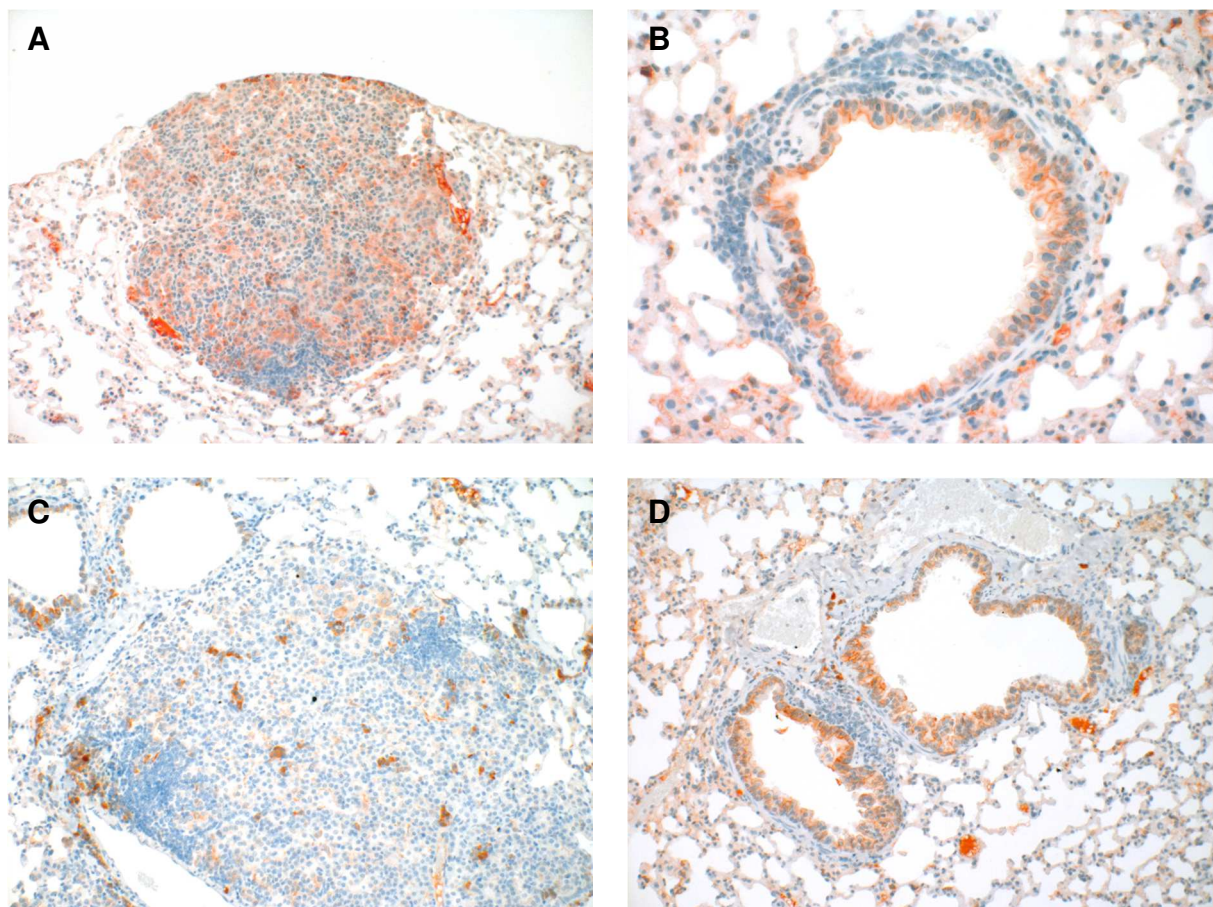


Abbildung 27: CXCL12/SDF-1-Expression in Lungentumoren von mit NNK und LPS (A, B) beziehungsweise mit NNK, LPS und AMD3100 (C, D) behandelten *Cxcl12-Cxcl12RFP/Cxcr4-eGFP-BAC*-Mäusen. A, C: NSCLC. B, D: SCLC. Immunhistochemie (rotbraune Färbung, Gegenfärbung mit Hämatoxylin). Originalvergrößerung: 200fach (A, C, D), 400fach (B).

5.3.2.4 Expression von CD34

Die Expression des endothelialen Oberflächenproteins CD34 konnte insbesondere in Blutgefäßanschnitten festgestellt werden. So zeigten sich zytoplasmatische und membranständige CD34-Positivitäten mit mäßiger bis starker Anfärbung vor allem in der Nähe von Bronchien und von Bronchiolen sowie häufig in unmittelbarer Tumorumgebung (siehe Abbildung 28).

In nichtkleinzelligen Lungentumoren erschienen vereinzelt CD34-exprimierende Zellen mit bevorzugt peripherer Lokalisation um Tumorgewebe. Den Ergebnissen des Pilotversuchs entsprechend wurde eine deutliche Kongruenz zur Expression des CXCR4 nachgewiesen, wobei mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Koexpression von CD34 und CXCR4 vorliegt. Lungentumoren mit kleinzelliger Differenzierung zeigten unabhängig vom intratumoralen CXCR4-Expressionsmuster lediglich vereinzelt CD34-positive Zellen. Es ergaben sich keine Unterschiede in der CD34-Expression in Abhängigkeit vom angewandten Behandlungsschema.

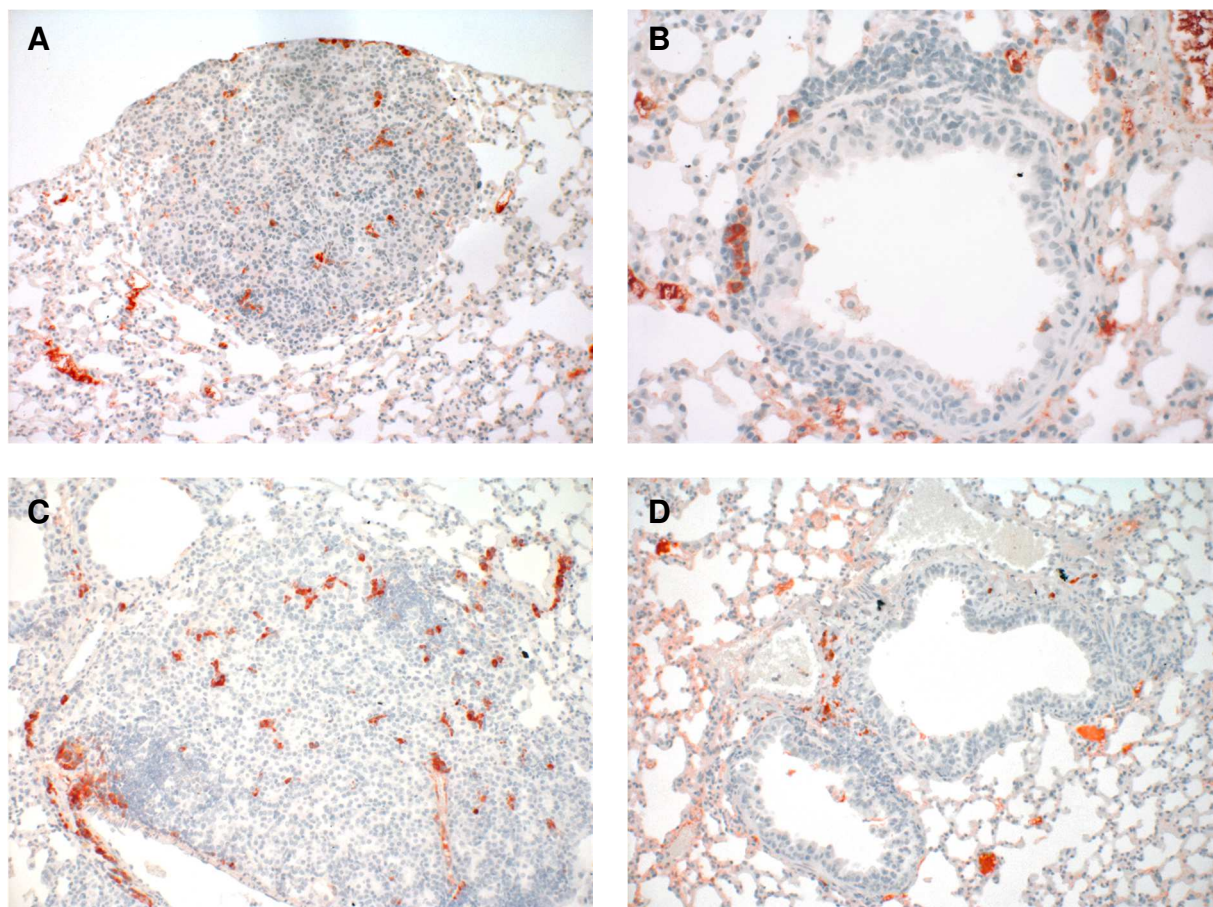


Abbildung 28: CD34-Expression in Lungentumoren von mit NNK und LPS (A, B) beziehungsweise mit NNK, LPS und AMD3100 (C, D) behandelten *Cxcl12-Cxcl12RFP/Cxcr4-eGFP*-BAC-Mäusen. A, C: NSCLC. B, D: SCLC. Immunhistochemie (rotbraune Färbung, Gegenfärbung mit Hämatoxylin). Originalvergrößerung: 200fach (A, C, D), 400fach (B).

5.3.2.5 Expression von Chromogranin A

Chromogranin A konnte immunhistochemisch mit mäßiger, teils starker Expression sowohl in den Tumorgeweben nichtkleinzelliger und kleinzelliger Bronchialkarzinome als auch im gesunden Normalgewebe nachgewiesen werden (siehe Abbildung 29). Hierbei zeigten Bronchialepithelzellen eine mäßige zytoplasmatische Anfärbung.

Nichtkleinzellige Lungentumoren wiesen unabhängig vom Behandlungsschema schwache bis mäßige Chromogranin A-Positivitäten vor allem in peripheren Tumorebenen auf. Mitunter waren ebenso diffus verteilte intratumorale Zellen mit starker zytoplasmatischer Chromogranin A-Expression erkennbar. In kleinzelligen Bronchialkarzinomen konnten Zellen mit deutlicher zytoplasmatischer Expression von Chromogranin A und inhomogener Verteilung im gesamten Tumoreal festgestellt werden. Im Unterschied zu den mit NNK, LPS und AMD3100 behandelten Versuchstieren, konnten in der Behandlungsgruppe mit NNK und LPS auch kleinzellige Tumorzellansammlungen ohne entsprechenden Chromogranin A-Nachweis aufgezeigt werden.

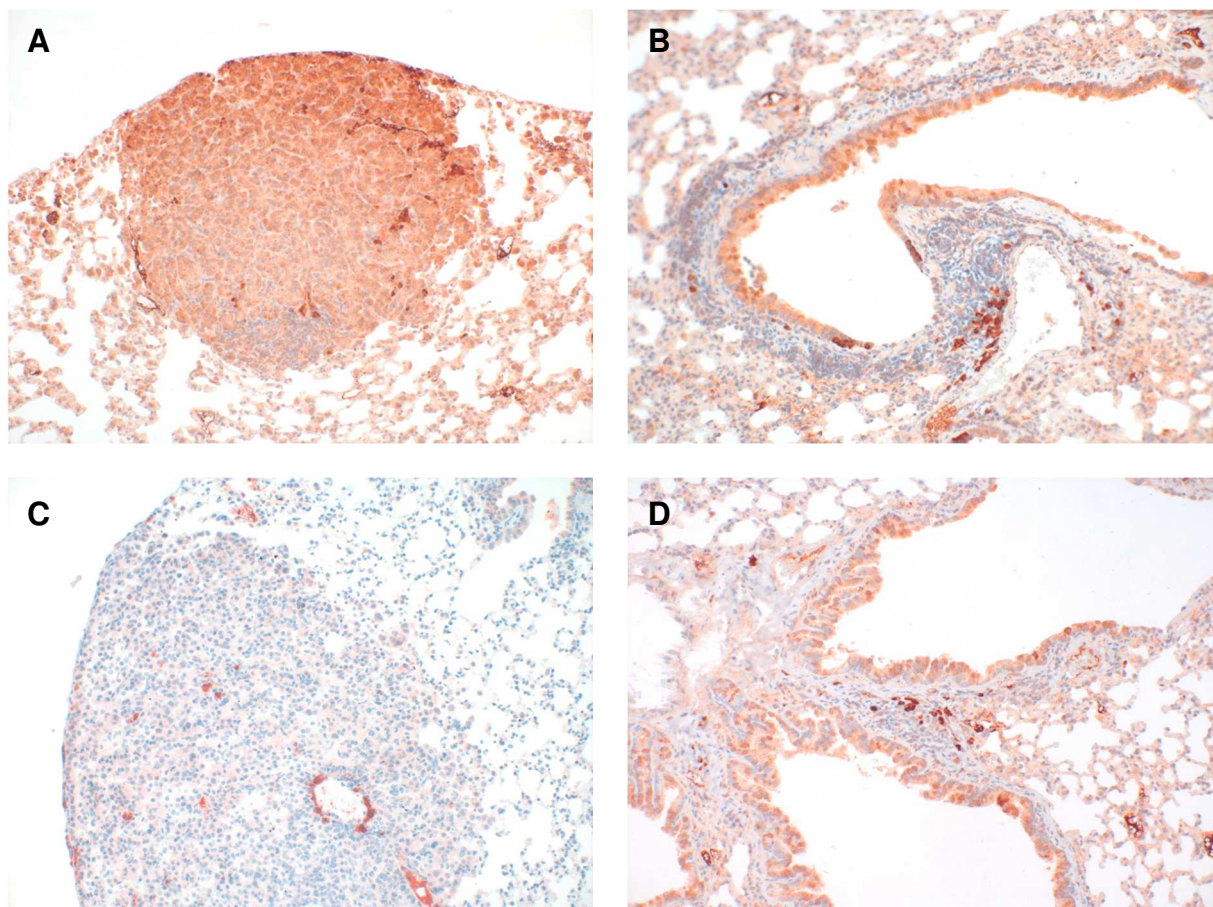


Abbildung 29: CgA-Expression in Lungentumoren von mit NNK und LPS (A, B) beziehungsweise mit NNK, LPS und AMD3100 (C, D) behandelten *Cxcl12-Cxcl12RFP/Cxcr4-eGFP-BAC*-Mäusen. A, C: NSCLC. B, D: SCLC. Immunhistochemie (rotbraune Färbung, Gegenfärbung mit Hämatoxylin). Originalvergrößerung: 100fach (C), 200fach (A, B, D).

5.3.2.6 Expression von Ki-67

Der immunhistochemische Nachweis des Proliferationsmarkers Ki-67 ergab in den Lungentumorgeweben und im Normalgewebe Positivitäten mit nachweisbarer Kernfärbung. Die physiologisch einer erhöhten Teilungsaktivität unterliegenden Bronchial- und Alveolarepithelzellen wiesen eine mäßige Ki-67-Expression auf.

In nichtkleinzelligen Lungentumoren war eine mäßige, vereinzelt starke Ki-67-Expression vor allem peripher gelegener Tumorbereiche feststellbar, wobei sich zwischen den Behandlungsgruppen keine Unterschiede im Expressionsmuster zeigten. Die Expression von Ki-67 in kleinzelligen Bronchialkarzinomen erwies sich unabhängig vom Behandlungsschema als variabel. Neben Tumoren mit deutlich Ki-67-positiven Zellen konnten Tumoren mit fehlenden beziehungsweise lediglich vereinzelt Ki-67-Positivitäten detektiert werden. Mitunter waren peripher gelegene Proliferationsfronten zu erkennen. Wie im Pilotversuch zeigte die Ki-67-Expression Ähnlichkeiten zur Expression von Chromogranin A (siehe Abbildung 29, Seite 75, und Abbildung 30).

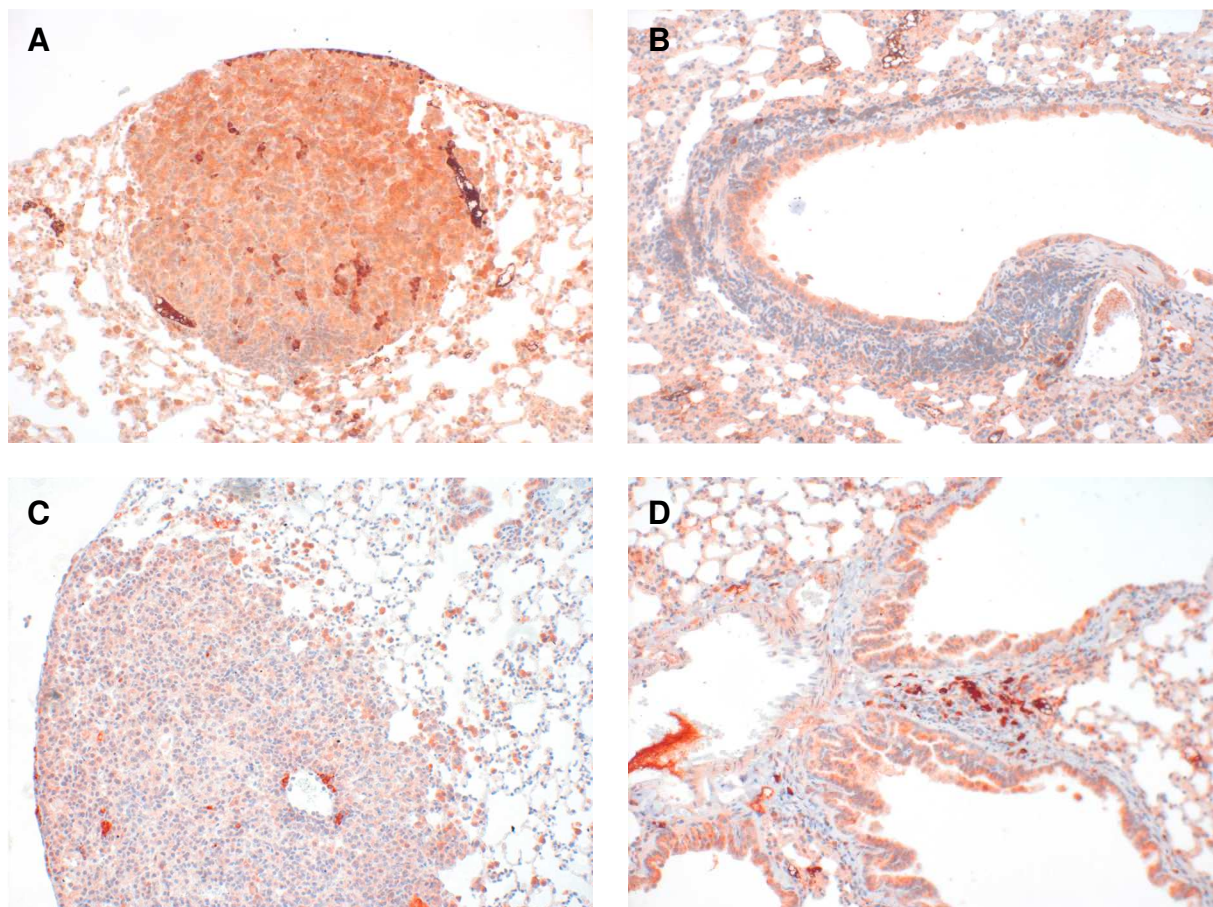


Abbildung 30: Ki-67-Expression in Lungentumoren von mit NNK und LPS (A, B) beziehungsweise mit NNK, LPS und AMD3100 (C, D) behandelten *Cxcl12-Cxcl12RFP/Cxcr4-eGFP-BAC*-Mäusen. A, C: NSCLC. B, D: SCLC. Immunhistochemie (rotbraune Färbung, Gegenfärbung mit Hämatoxylin). Originalvergrößerung: 100fach (C), 200fach (A, B, D).

5.3.2.7 Expression des SSTR2

In der immunhistochemischen Darstellung des Somatostatin-Rezeptors SSTR2 konnten lediglich vereinzelt mäßige SSTR2-Positivitäten festgestellt werden. Im tumorfreien Lungengewebe zeigte sich keine Expression des SSTR2.

Lungentumoren mit nichtkleinzelliger Differenzierung wiesen unabhängig vom angewandten Behandlungsschema keine SSTR2-positiven Zellen auf. In kleinzelligen Bronchialkarzinomen konnten vereinzelte, überwiegend peripher im Tumorgewebe gelegene SSTR2-positive Zellen mit mäßiger zytoplasmatischer Anfärbung nachgewiesen werden, wobei keine Abhängigkeit von der Tumorgroße bestand. Die mit NNK und LPS beziehungsweise mit NNK, LPS und AMD3100 behandelten Versuchstiere zeigten hierbei keine Unterschiede in der Expression des SSTR2. Die nachstehende Abbildung 31 verdeutlicht die SSTR2-Expression an ausgewählten nichtkleinzelligen und kleinzelligen Lungentumoren.

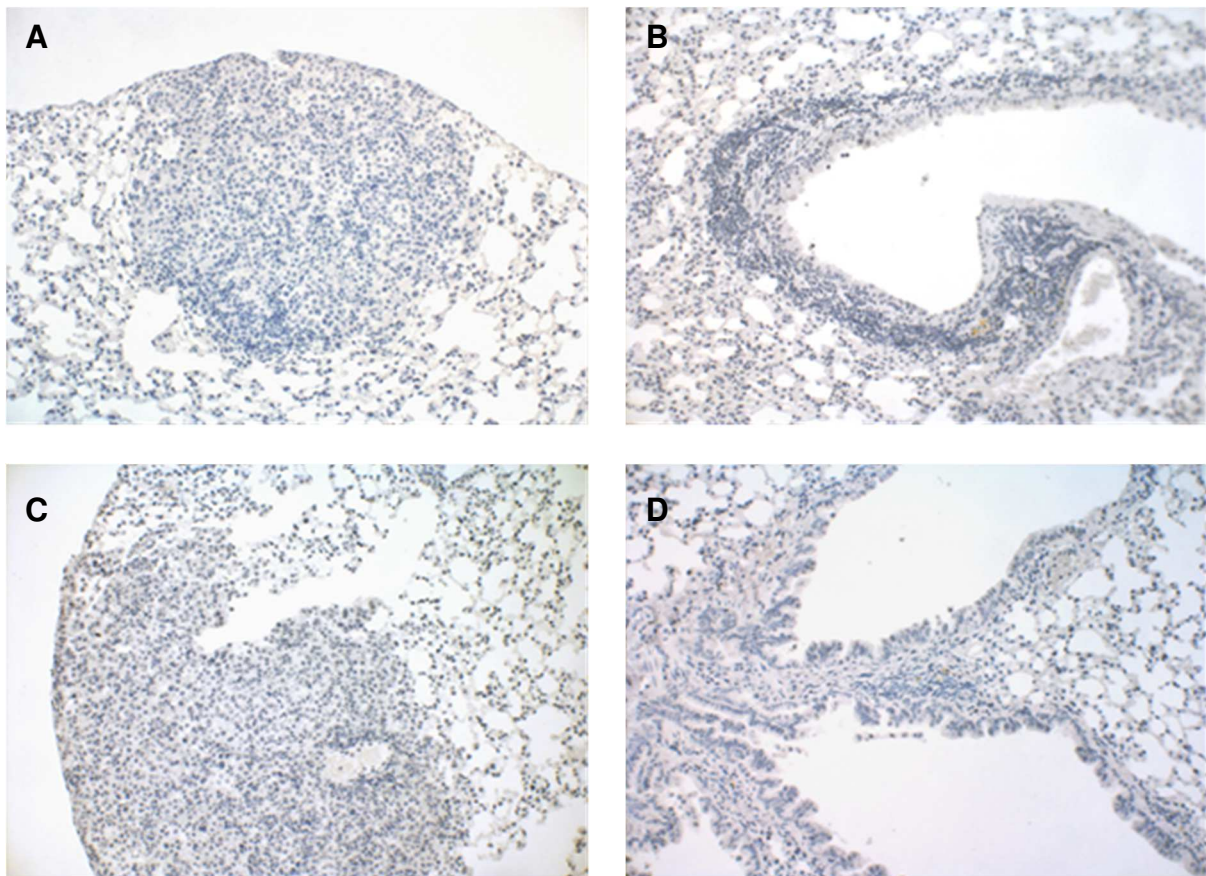


Abbildung 31: SSTR2-Expression in Lungentumoren von mit NNK und LPS (A, B) beziehungsweise mit NNK, LPS und AMD3100 (C, D) behandelten *Cxcl12-Cxcl12RFP/Cxcr4-eGFP-BAC*-Mäusen. A, C: NSCLC. B, D: SCLC. Immunhistochemie (rotbraune Färbung, Gegenfärbung mit Hämatoxylin). Originalvergrößerung: 100fach (C), 200fach (A, B, D).

5.3.3 Auswertung der Immunhistochemie an Free-Floating-Schnitten

5.3.3.1 Expression des CXCR4

Die Expression des Chemokinrezeptors CXCR4 konnte mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie im gesunden Lungengewebe sowie in nichtkleinzelligen und kleinzelligen Lungentumoren beider Behandlungsgruppen aufgezeigt werden. Aufgrund der Phosphosensitivität des Anti-CXCR4-Antikörpers UMB-2 erfolgte die CXCR4-Darstellung wiederum ohne und mit LPP-Behandlung der Gewebeschnitte. Eine Intensitätszunahme des CXCR4-Expressionsmusters nach der Behandlung der Präparate mit LPP wurde allerdings in der Behandlungsgruppe mit NNK und LPS entgegen der Erwartung nicht bestätigt. Bei den mit NNK, LPS und AMD3100 behandelten Mäusen konnte ebenfalls kein Unterschied in der CXCR4-Expression zwischen den Präparaten ohne und mit LPP-Behandlung nachgewiesen werden.

Im Normalgewebe wurden zahlreiche homogen verteilte CXCR4-exprimierende Zellen detektiert. Diese CXCR4-Expression zeigte sich insbesondere in den Alveolarsepten sowie den Bronchialepithelien und beweist am ehesten das Vorhandensein CXCR4-exprimierender Immunzellen.

In nichtkleinzelligen Lungentumoren gelang der Nachweis von CXCR4-positiven Zellen bevorzugt in peripheren Tumorbereichen. Kleinzellige Lungentumoren erwiesen sich hinsichtlich der Expression des CXCR4 als auffallend variabel, wobei neben Tumoren mit deutlichen Positivitäten auch Tumoren ohne einen entsprechenden CXCR4-Nachweis festgestellt wurden. Die Tumorgroße zeigte unabhängig von der Entität keinen Zusammenhang mit dem Ausmaß der CXCR4-Expression. Analog zu den Ergebnissen der immunhistochemischen Färbung an Paraffinschnitten wurden abhängig vom Behandlungsschema Unterschiede in der Rezeptorlokalisierung des CXCR4 deutlich. Die Behandlungsgruppe mit NNK und LPS zeigte überwiegend zytoplasmatische Positivitäten mit homogener Signalintensität in der gesamten Zelle. Im Unterschied zur immunhistochemischen Färbung an Paraffinschnitten konnten hierbei jedoch keine zytoplasmatischen Granula erkannt werden. Die Tumorgewebe der mit NNK, LPS und AMD3100 behandelten Mäuse wiesen eine membranständige Lokalisation des CXCR4 mit deutlicher Abzeichnung der Zellgrenzen und Aussparung zytoplasmatischer Zellbereiche auf. In den Abbildungen 32, Seite 80, und 33, Seite 81, sind die CXCR4-Expressionsmuster nichtkleinzelliger und kleinzelliger Lungentumoren beider Behandlungsgruppen ohne und mit LPP-Behandlung dargestellt.

5.3.3.2 Expression von eGFP

Der Nachweis des grün fluoreszierenden Proteins im tumorfreien Normalgewebe und in den Tumorgeweben nichtkleinzelliger und kleinzelliger Lungentumoren erfolgte neben der Verwendung eines spezifischen Anti-eGFP-Antikörpers auch durch die natürliche Autofluoreszenz in der *Cxcl12-Cxcl12RFP/Cxcr4-eGFP*-BAC-Mauslinie.

Im gesamten gesunden Lungengewebe waren homogen verteilte eGFP-positive Zellen mit überwiegend zytoplasmatischer Anfärbung nachweisbar. Ebenso wie im Pilotversuch wurden in den Bronchialepithelien allenfalls vereinzelt eGFP-Positivitäten festgestellt. Nichtkleinzellige und kleinzellige Lungentumoren wiesen im gesamten Tumorbereich eGFP-exprimierende Zellen mit zytoplasmatischer Anfärbung auf, ohne eine bevorzugte intratumorale Lokalisation dieser Positivitäten aufzuzeigen. Den Tumorentitäten gemeinsam war eine direkte Abhängigkeit der eGFP-Expression von der Tumorgroße. Verglichen mit der CXCR4-Expression zeigte sich eine höhere Anzahl an eGFP-exprimierenden Zellen.

5.3.3.3 Expression von CXCL12/SDF-1

Das physiologisch von Bindegewebszellen und Endothelzellen der Lunge exprimierte Chemokin CXCL12/SDF-1 wurde im gesamten tumorfreien Lungengewebe detektiert. Vor allem im Bereich des Bronchialepithels, des subepithelialen Bindegewebes und der Alveolarsepten zeigte sich eine CXCL12/SDF-1-Expression mit homogener Verteilung dieser CXCL12/SDF-1-positiven Zellen.

In nichtkleinzelligen Lungentumoren konnte ebenfalls der Nachweis von CXCL12/SDF-1 mit inhomogenem Verteilungsmuster erbracht werden, wobei überwiegend in peripheren Tumorarealen, in direkter Tumorumgebung sowie vereinzelt zentral gelegene Positivitäten festzustellen waren. Kleinzellige Bronchialkarzinome wiesen mehrheitlich lediglich vereinzelt intratumoral gelegene, CXCL12/SDF-1-positive Zellen auf, ohne einen direkten Zusammenhang zu der Tumorgroße aufzuzeigen. Die Ausprägung des CXCL12/SDF-1-Expressionsmusters zeigte keinen Unterschied in Abhängigkeit vom Behandlungsschema und entsprach den Ergebnissen des Pilotversuchs. In den nachstehenden Abbildungen 32 E und F sowie 33 E und F ist die Expression des CXCL12/SDF-1 in nichtkleinzelligen und kleinzelligen Lungentumoren nach Behandlung mit NNK und LPS beziehungsweise mit NNK, LPS und AMD3100 dargestellt. Die deutliche Abzeichnung des Bronchialepithels und des subepithelialen Bindegewebes innerhalb des Normalgewebes ist besonders in Abbildung 33 F zu erkennen.

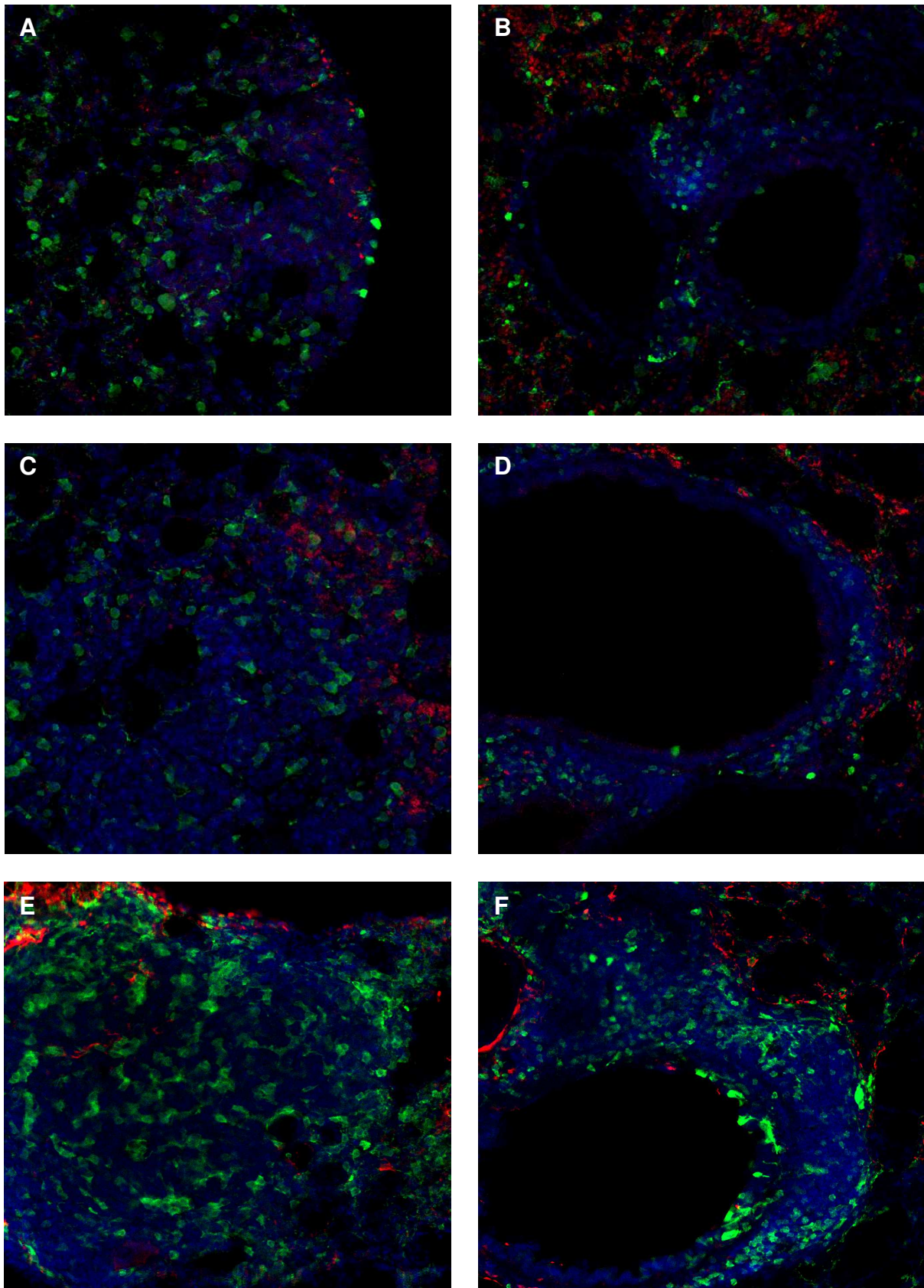


Abbildung 32: Nachweis der CXCR4-Expression unter Verwendung des Antikörpers UMB-2 ohne LPP-Behandlung (A, B), mit LPP-Behandlung (C, D) und CXCL12/SDF-1-Expression (E, F) in Lungentumoren von mit NNK und LPS behandelten *Cxcl12-Cxcl12RFP/Cxcr4-eGFP*-BAC-Mäusen. A, C, E: NSCLC. B, D, F: SCLC. Fluoreszenzmikroskopie (rot: CXCR4, CXCL12/SDF-1, grün: eGFP, blau: DAPI). Originalvergrößerung: 200fach (A-F).

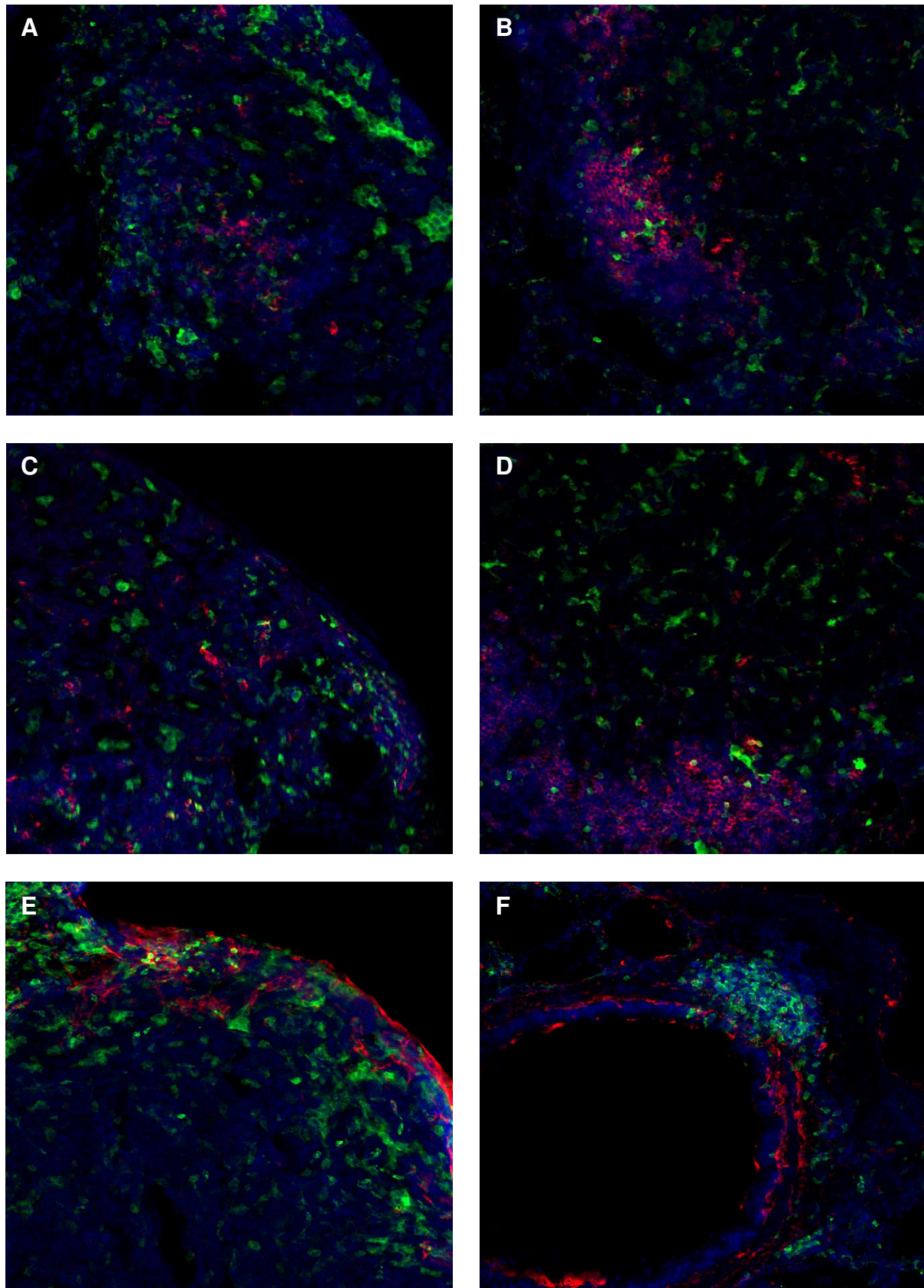


Abbildung 33: Nachweis der CXCR4-Expression unter Verwendung des Antikörpers UMB-2 ohne LPP-Behandlung (A, B), mit LPP-Behandlung (C, D) und CXCL12/SDF-1-Expression (E, F) in Lungentumoren von mit NNK, LPS und AMD3100 behandelten *Cxcl12-Cxcl12RFP/Cxcr4-eGFP*-BAC-Mäusen. A, C, E: NSCLC. B, D, F: SCLC. Fluoreszenzmikroskopie (rot: CXCR4, CXCL12/SDF-1, grün: eGFP, blau: DAPI). Originalvergrößerung: 200fach (A-F).

5.3.3.4 Expression ausgewählter Immunzellmarker

Analog zum Pilotversuch erfolgte die Untersuchung der Expression spezifischer Immunzellmarker zur weiteren Charakterisierung CXCR4-exprimierender Leukozytenpopulationen und deren Abgrenzung zu CXCR4-positiven Tumorzellen. Dargestellt wurden hierzu die Expressionsmuster von CD11b, CD31, CD68 und Gr-1. Hinsichtlich dieser Immunzellmarker konnte kein Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen mit NNK und LPS beziehungsweise mit NNK, LPS und AMD3100 festgestellt werden. In CD11b- und CD68-positiven, nicht aber in CD31- und Gr-1-exprimierenden Zellen war mitunter eine Koexpression mit eGFP erkennbar. Die Abbildungen 34, Seite 84, sowie 35 A und B, Seite 85, veranschaulichen die Expression der Immunzellmarker.

Das Oberflächenprotein CD11b wird vor allem von Leukozyten wie Monozyten, Granulozyten, Makrophagen und NK-Zellen gebildet. Im gesamten Normalgewebe erschienen unter Betonung der Alveolarsepten solitäre CD11b-exprimierende Zellen mit homogener Verteilung. Das im Pilotversuch aufgezeigte Lokalisationsmuster dieser Zellen in unmittelbarer Nähe zu Bronchialepithelien konnte dabei nicht bestätigt werden. Die Tumorgewebe nichtkleinzelliger und kleinzelliger Lungentumoren fielen durch eine auffallend geringere Konzentration an CD11b-Positivitäten auf, ohne eine Abhängigkeit des Expressionsmusters von der Tumorgröße oder der Entität aufzuweisen. Intratumoral waren lediglich vereinzelt CD11b-positive Zellen erkennbar.

Die CD31-Expression durch Endothelzellen und bestimmte Immunzellen ergab im gesunden Lungengewebe analog zu den Ergebnissen des Pilotversuchs eine nahezu vollständige Abzeichnung von Alveolarsepten und von Bronchien mit homogenem Verteilungsmuster und deutlicher Aussparung der Tumorgewebe nichtkleinzelliger und kleinzelliger Lungentumoren. Diese erschienen wiederum unabhängig von der Tumorgröße und der Entität mehrheitlich ohne intratumorale CD31-Positivitäten. Die Positivitäten im Normalgewebe und vereinzelt im Tumorgewebe sind vermutlich auf CD31-exprimierende Endothelzellen und Immunzellen zurückzuführen.

Der Nachweis des Immunzellmarkers CD68 kann unter anderem in Makrophagen und insbesondere deren zytoplasmatischen Granula erbracht werden. Im Unterschied zu den Ergebnissen des Pilotversuchs wurde hierbei eine deutliche CD68-Expression des gesamten tumorfreien Normalgewebes festgestellt. Vor allem in den Alveolarsepten

und in den Bronchialepithelien waren CD68-positive Zellen mit hoher Konzentration nachweisbar, was am ehesten auf eine massive Infiltration mit Entzündungszellen zurückzuführen ist. CD68-Positivitäten zeigten sich in nichtkleinzelligen und in kleinzelligen Lungentumoren gleichermaßen überwiegend peripher und an das Normalgewebe angrenzend.

Das von neutrophilen Granulozyten exprimierte Oberflächenprotein Gr-1 war im Normalgewebe ebenso wie in nichtkleinzelligen und kleinzelligen Lungentumoren unabhängig von der Tumorgroße nachweisbar. Die Gr-1-Expression zeigte sich hierbei in mehreren, häufig in Gruppen zusammenliegenden Zellen mit inhomogener Verteilung und ohne Aufzeigen einer bevorzugten Lokalisation im Gewebe. Auffallende Unterschiede im intratumoralen Expressionsmuster waren anders als im Pilotversuch nicht erkennbar. Mitunter waren die Tumoren sogar vollständig Gr-1-negativ.

5.3.3.5 Expression von CD34

Der Nachweis des physiologischerweise von Endothelzellen exprimierten Oberflächenproteins CD34 konnte im Normalgewebe ebenso wie in nichtkleinzelligen und kleinzelligen Lungentumoren erbracht werden. Das gesamte tumorfreie Lungengewebe zeigte CD34-exprimierende Zellen mit homogenem Verteilungsmuster, wodurch sich neben Bronchien, Bronchiolen und Alveolarsepten auch tumornahe Normalgewebsareale deutlich abzeichneten.

Nichtkleinzellige Lungentumoren wiesen insbesondere in peripheren Tumorbereichen CD34-positive Zellen auf, die am ehesten intratumoral gelegene Blutgefäße mit endothelialer CD34-Expression darstellen. Zwischen der Tumorgroße und der Anzahl CD34-exprimierender Zellen konnte hierbei eine direkte Abhängigkeit festgestellt werden. In kleinzelligen Bronchialkarzinomen waren intratumoral unabhängig von deren Größe mehrheitlich keine CD34-exprimierenden Zellen feststellbar. Die Behandlungsgruppen unterschieden sich hinsichtlich der Expression des CD34 nicht. Die Abbildungen 35 C und D, Seite 85, verdeutlichen in diesem Zusammenhang die CD34-Expression in einem nichtkleinzelligen und in einem kleinzelligen Lungentumor. Deutlich zu erkennen ist ein innerhalb des nichtkleinzelligen Lungentumors gelegenes Blutgefäß mit endothelialer CD34-Expression, wohingegen das kleinzellige Bronchialkarzinom lediglich in unmittelbarer Tumorumgebung CD34-Positivitäten zeigt. Eine Koexpression von CD34 und eGFP wurde nicht festgestellt.

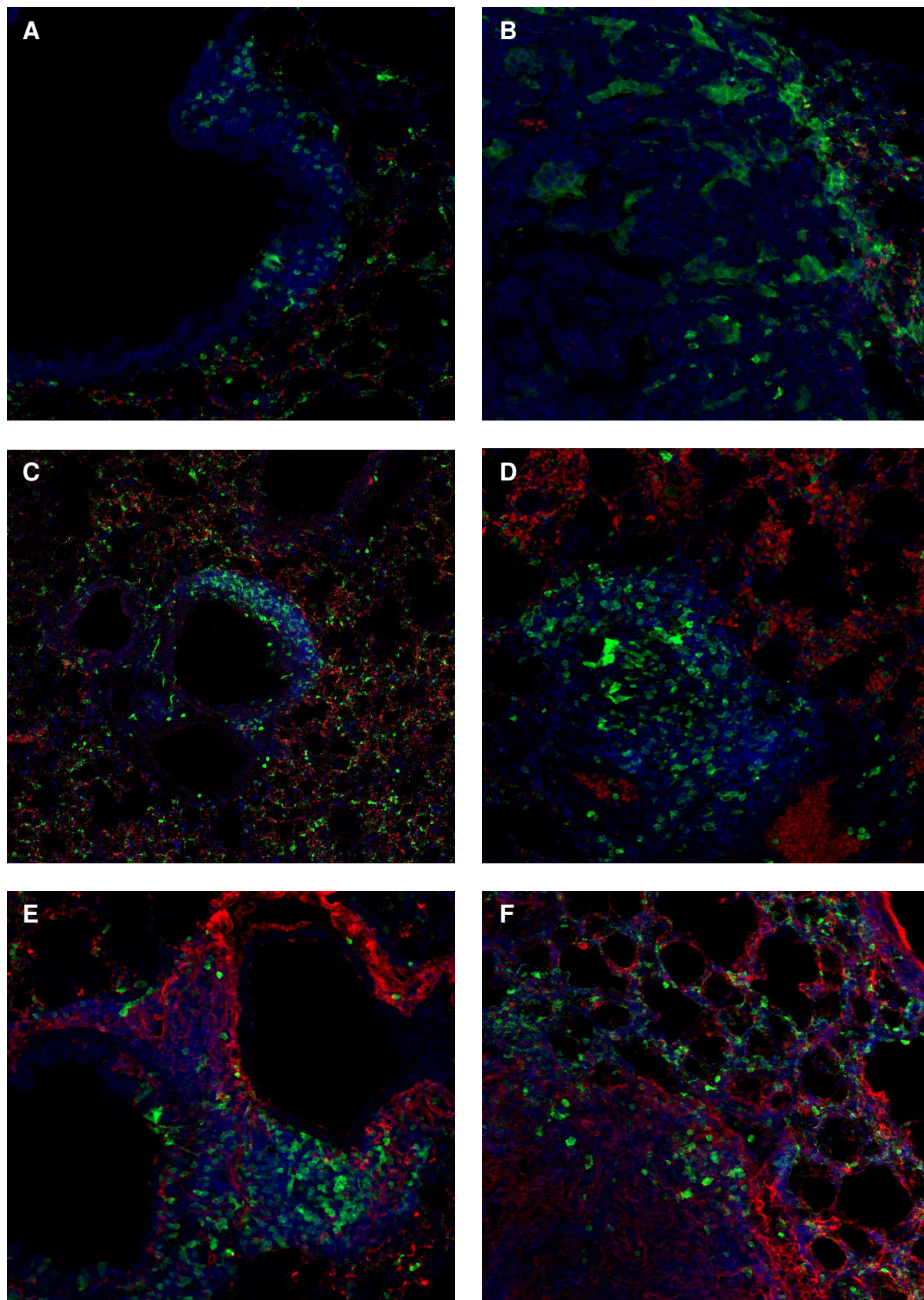


Abbildung 34: Expression von CD11b (A, B), CD31 (C, D), CD68 (E, F) in Lungentumoren von mit NNK und LPS (A, C, E) beziehungsweise mit NNK, LPS und AMD3100 (B, D, F) behandelten *Cxcl12-Cxcl12RFP/Cxcr4-eGFP-BAC*-Mäusen. A, C, E: SCLC. B, D, F: NSCLC. Fluoreszenzmikroskopie (rot: CD11b, CD31, CD68, grün: eGFP, blau: DAPI). Originalvergrößerung: 100fach (C), 200fach (A, B, D, E, F).

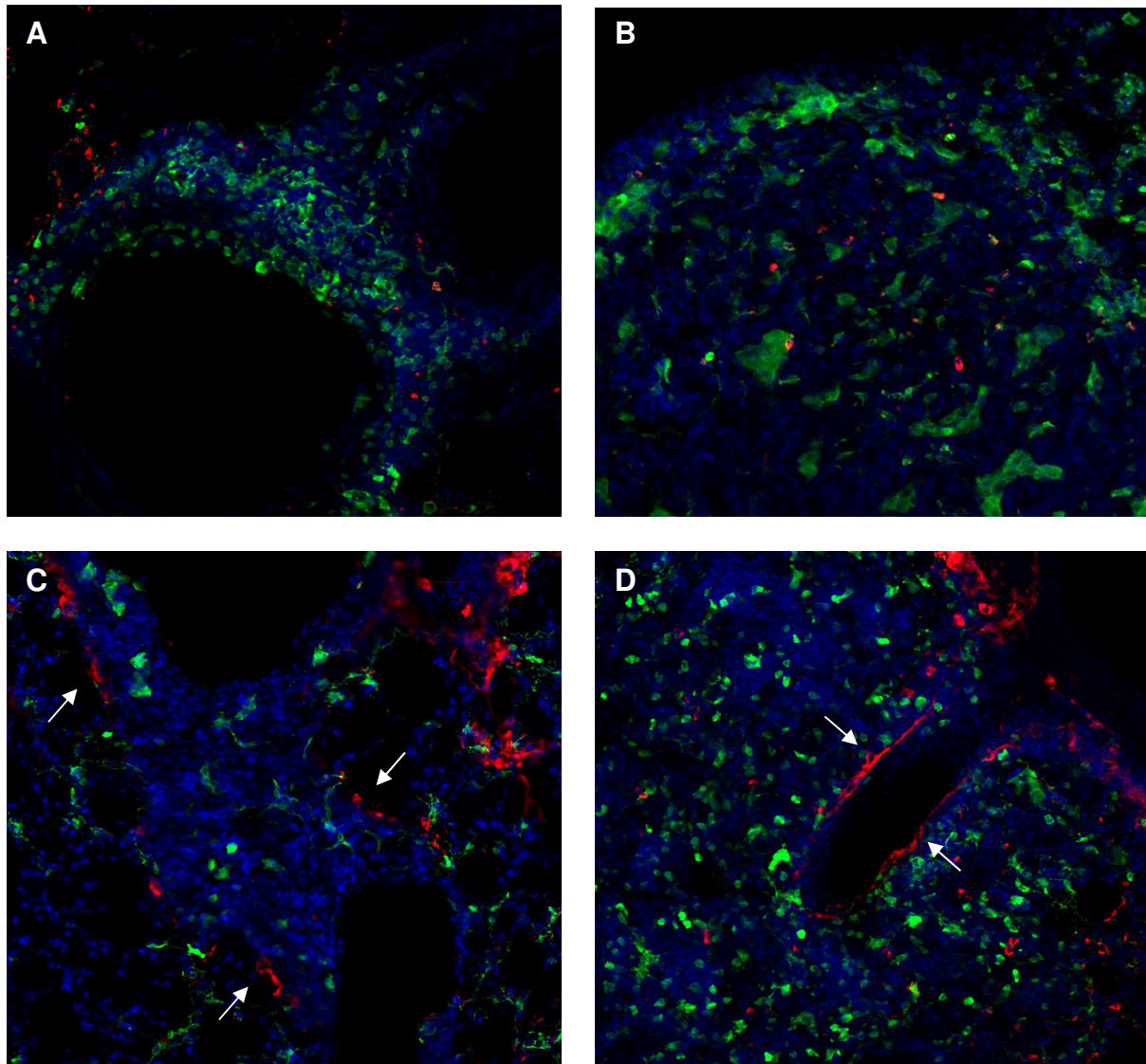


Abbildung 35: Expression von Gr-1 (A, B) und CD34 (C, D) in Lungentumoren von mit NNK und LPS (A, C) beziehungsweise mit NNK, LPS und AMD3100 (B, D) behandelten *Cxcl12-Cxcl12RFP/Cxcr4-eGFP-BAC*-Mäusen. A, C: SCLC. B, D: NSCLC. Die Pfeile deuten auf die CD34-exprimierenden Zellen von in unmittelbarer Nähe eines kleinzelligen Lungentumors gelegenen Blutgefäßen (C) sowie eines Blutgefäßlängsschnitts innerhalb eines nichtkleinzelligen Lungentumors (D). Fluoreszenzmikroskopie (rot: Gr-1, CD34, grün: eGFP, blau: DAPI). Originalvergrößerung: 200fach (A-D).

5.3.3.6 Expression von Ki-67

Im tumorfreien Normalgewebe wurden Ki-67-exprimierende Zellen vor allem in Bronchialepithelien festgestellt, die physiologischerweise einer erhöhten Teilungsaktivität unterliegen.

In nichtkleinzelligen Lungentumoren erschienen vor allem periphere Tumorbereiche Ki-67-positiv. Mitunter wurden intratumoral lediglich vereinzelte Positivitäten nachgewiesen. Kleinzellige Bronchialkarzinome zeigten mehrheitlich eine Ki-67-Expression mit inhomogenem Verteilungsmuster im gesamten Tumorgewebe. Insgesamt wurde

eine Abhängigkeit von der Tumorgroße deutlich, indem größere Lungentumoren unabhängig von ihrer Entität vermehrt Ki-67-Positivitäten aufwiesen. Zwischen den beiden Behandlungsgruppen mit NNK und LPS beziehungsweise NNK, LPS und AMD3100 konnten keine Unterschiede in der Ki-67-Expression aufgezeigt werden. Die Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie hinsichtlich der Ki-67-Expression entsprechen im Wesentlichen denen der immunhistochemischen Färbung an Paraffinschnitten und stimmen mit denen des vorangegangenen Pilotversuchs überein. In Abbildung 36 ist die Ki-67-Expression von nichtkleinzelligen und kleinzelligen Lungentumoren beider Behandlungsgruppen dargestellt.

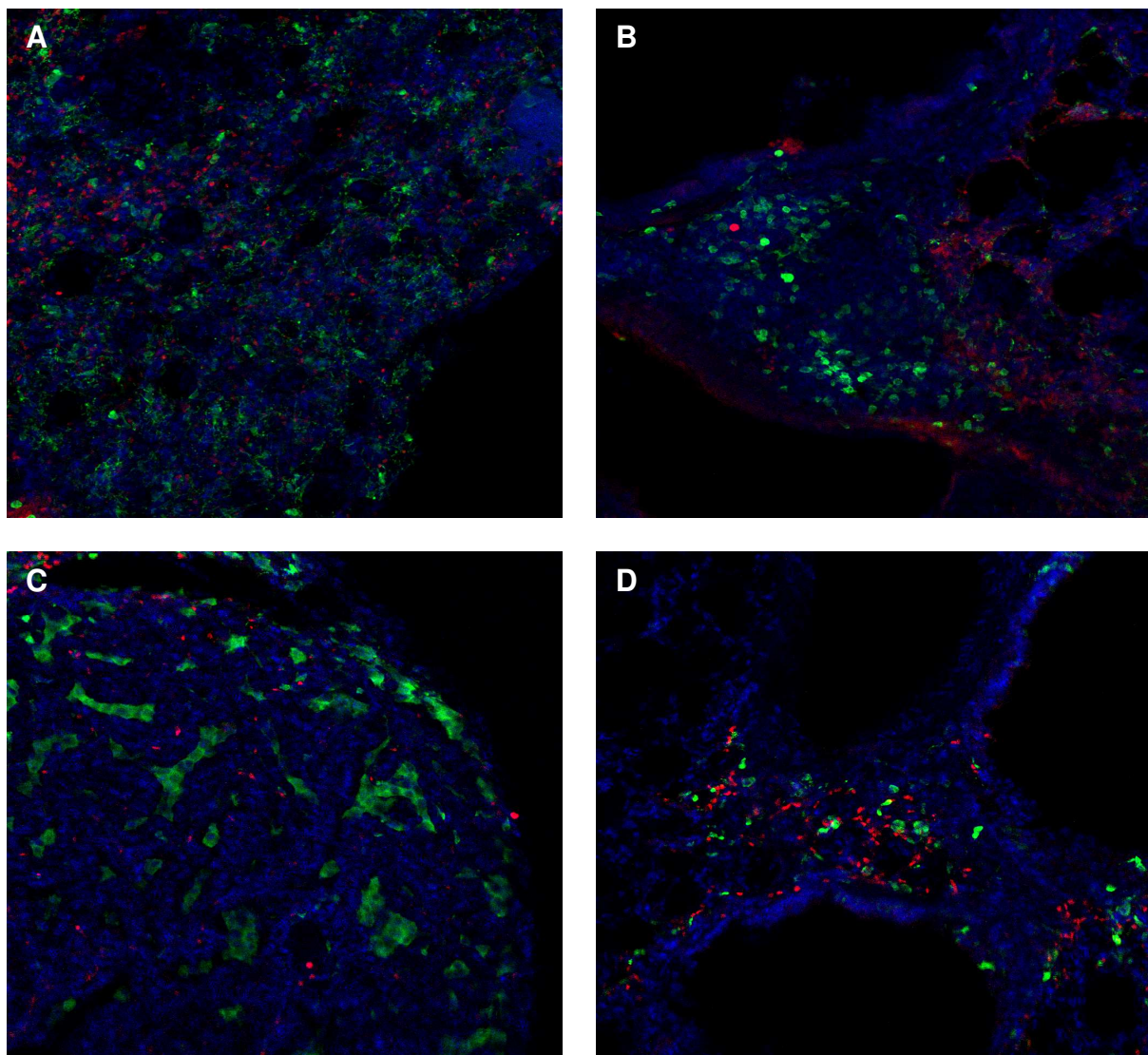


Abbildung 36: Expression von Ki-67 in Lungentumoren von mit NNK und LPS (A, B) beziehungsweise mit NNK, LPS und AMD3100 (C, D) behandelten *Cxcl12-Cxcl12RFP/Cxcr4-eGFP*-BAC-Mäusen. A, C: NSCLC. B, D: SCLC. Fluoreszenzmikroskopie (rot: Ki-67, grün: eGFP, blau: DAPI). Originalvergrößerung: 200fach (A-D).

6 Diskussion

6.1 Tumorinduktion mit NNK und LPS

Die Entstehung von murinen Lungentumoren auf der Basis eines chemisch induzierten tierexperimentellen Modells ist zur Nachbildung des mehrstufigen Prozesses der Lungentumorbildung beim Menschen geeignet. Neben der Nachahmung der physiologischen Entstehung von humanen Lungentumoren, deren Pathogenese maßgeblich mit der Zigarettenrauchinhalation als Hauptrisikofaktor assoziiert ist, wird dabei ebenso eine morphologische Ähnlichkeit zu humanen Lungentumoren erreicht (Gazdar et al. 2015, Goeckenjan et al. 2011, Herold 2015). Die in dieser Dissertation durchgeführte chemische Tumorinduktion entsprach dem von der Arbeitsgruppe um Keohavong beschriebenen Lungentumor-Modell mit dem tabakspezifischen, vom Nikotin abgeleiteten Nitrosamin-Keton NNK und den Lipopolysacchariden gramnegativer Bakterien. Die Lungentumoren wurden in zwei verschiedenen transgenen Mauslinien, in *Cxcr4-eGFP-BAC*-Mäusen im Pilotversuch und in *Cxcl12-Cxcl12RFP/Cxcr4-eGFP-BAC*-Mäusen im Hauptversuch, induziert.

In jeder der zehn mit NNK und LPS behandelten *Cxcr4-eGFP-BAC*-Mäuse im Pilotversuch sowie der neun gleichermaßen behandelten *Cxcl12-Cxcl12RFP/Cxcr4-eGFP-BAC*-Mäuse im Hauptversuch wurden zahlreiche Lungentumoren sowohl mit nicht-kleinzelliger, als auch mit kleinzelliger Differenzierung detektiert. Die drei zusätzlich mit AMD3100 behandelten *Cxcl12-Cxcl12RFP/Cxcr4-eGFP-BAC*-Mäuse wiesen ebenso eine Vielzahl an Lungentumoren beider Entitäten auf. In einer von zwölf *Cxcr4-eGFP-BAC*-Mäusen, die lediglich eine Behandlung mit LPS erhielten, konnte ebenfalls ein kleinzelliges Bronchialkarzinom nachgewiesen werden. Dies bildet einen Unterschied zu den von Keohavong et al. beschriebenen Ergebnissen, bei denen die 15 Mäuse der Behandlungsgruppe mit LPS vollständig tumorfrei erschienen. Unabhängig von der Art des angewandten Behandlungsschemas und der transgenen Mauslinie zeigten alle Mäuse, die eine LPS-Applikation erhalten hatten, eine perivaskuläre und peribronchiale Infiltration des Lungengewebes mit Entzündungszellen. In den zwei *Cxcr4-eGFP-BAC*-Mäusen und den vier *Cxcl12-Cxcl12RFP/Cxcr4-eGFP-BAC*-Mäusen der Kontrollgruppen ohne entsprechende Behandlung waren weder eine Lungentumorbildung, noch eine perivaskuläre oder peribronchiale Entzündungszellinfiltration festzustellen. Eine spontane Lungentumorbildung ohne chemische Induktion konnte somit in beiden transgenen Mauslinien erfolgreich ausgeschlossen werden.

Bronchialepithelzellen und andere Oberflächenepithelzellen sowie Zellen des angeborenen Immunsystems, wie Alveolarmakrophagen und neutrophile Granulozyten, reagieren auf LPS nach dessen Erkennung und Bindung durch Pattern-Recognition-Rezeptoren (Molteni et al. 2016). Infolge dieser Aktivierung erfolgt die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen, unter anderem Tumornekrosefaktor- α , Interleukin-1, Interleukin-6 und Interleukin-8, die ihrerseits die Aktivierung und die Migration weiterer Alveolarmakrophagen und neutrophiler Granulozyten sowie Zellen der adaptiven Immunabwehr bedingen (Engels 2008, Keohavong et al. 2011, Khair et al. 1996). Die in den mit LPS behandelten *Cxcr4-eGFP*-BAC-Mäusen und *Cxcl12-Cxcl12RFP/Cxcr4-eGFP*-BAC-Mäusen festgestellte Infiltration des Lungengewebes mit Entzündungszellen ist daher als direkter Ausdruck der LPS-vermittelten Aktivierung des angeborenen Immunsystems zu verstehen. Weiterhin werden reaktive Sauerstoffverbindungen und Stickstoffverbindungen sowie proteolytische Enzyme freigesetzt, die mit einer akuten und chronischen Schädigung des Lungengewebes, der DNA-Reparaturenzyme und der DNA selbst zu einer Entstehung von Mutationen und Tumoren führen können (Keohavong et al. 2011, Khair et al. 1996). Eine Entzündungsinduzierte Schädigung kann somit als Initiator und als Promotor bei der Tumorentstehung dienen (Engels 2008). Infolgedessen besteht die Möglichkeit einer LPS-induzierten Lungentumorbildung auf der Basis einer chronischen Entzündungsreaktion, wie sie in einer von zwölf lediglich mit LPS behandelten *Cxcr4-eGFP*-BAC-Mäusen durch den Nachweis eines kleinzelligen Bronchialkarzinoms gezeigt wurde.

Das tabakspezifische, vom Nikotin abgeleitete Nitrosamin-Keton NNK wird als das am potentesten wirkende Karzinogen des Tabakrauchs angesehen. Die metabolische Umsetzung von NNK führt zur Entstehung elektrophiler Verbindungen, die zur Reaktion mit nukleophilen Bestandteilen der DNA fähig sind (Hecht et al. 2016). Die Entstehung von Lungentumoren ist dabei Ausdruck einer direkten Wechselwirkung mit der DNA unter Ausbildung von DNA-Addukten und der durch die Alkylierung von DNA-Basen vermittelten Entstehung von Basenfehlpaarungen und Mutationen (Akopyan und Bonavida 2006, Hecht et al. 2016). Zigarettenrauch und dessen Bestandteile, wie unter anderem auch LPS, können ihrerseits außer einer karzinogenen Wirkung ebenso eine Entzündungsreaktion bedingen (Engels 2008, Hasday et al. 1999). Neben der Entstehung von nichtkleinzelligen Lungentumoren wird dem chemisch induzierten tierexperimentellen Modell mit NNK und LPS auch die Bildung von Lungentumoren mit

kleinzelliger Differenzierung zugesprochen (Gazdar et al. 2015). Durch die Entwicklung von Lungentumoren beider Entitäten in allen mit NNK und LPS behandelten Versuchstieren beider transgenen Mauslinien, erweist sich das von Keohavong et al. beschriebene Modell einer chemischen Tumorinduktion als zuverlässiges murines Lungentumor-Modell.

Als Nebenzielgröße wurden in der vorliegenden Arbeit die Tiergewichte der Behandlungstiere und der Kontrolltiere der *Cxcr4-eGFP*-BAC-Mauslinie beziehungsweise der *Cxcl12-Cxcl12RFP/Cxcr4-eGFP*-BAC-Mauslinie während des 17-wöchigen beziehungsweise 19-wöchigen Untersuchungszeitraums erfasst. Sowohl im Pilotversuch als auch im Hauptversuch konnte bei den mit NNK und LPS behandelten Tieren eine deutlich erkennbare Reduktion des Tiergewichts innerhalb der ersten fünf Behandlungswochen festgestellt werden. Weiterhin war in keiner der lediglich mit LPS behandelten *Cxcr4-eGFP*-BAC-Mäuse im Pilotversuch oder der Kontrolltiere beider transgenen Mauslinien ohne entsprechende Behandlung mit NNK und LPS eine derartige Reduktion der Tiergewichte nachzuweisen. Nach Abschluss der NNK-Behandlung wurde nach einwöchiger Latenz ein stetiger Gewichtsanstieg der Behandlungstiere mit NNK und LPS mit Annäherung an das Gewichtsniveau der Kontrolltiere verzeichnet. Bei der Reduktion der Tiergewichte besteht somit am ehesten eine direkte Abhängigkeit zur Gabe von NNK, die innerhalb der ersten vier Wochen des Untersuchungszeitraums jeweils zweimal an zwei Tagen der Woche erfolgte. Der mutmaßlich NNK-induzierte Effekt der Gewichtsreduktion ist demnach weder Ausdruck einer Lungentumorbildung, noch einer Tumorkachexie eines Terminalstadiums.

Ein NNK-induzierter Gewichtsverlust wurde von der Arbeitsgruppe Dahl et al. beschrieben, die eine Abhängigkeit zwischen der Gewichtsreduktion und der Dosis des intrapulmonal instillierten NNK feststellten und die Gewichtsabnahme auf die toxischen Effekte dieses Nitrosamins zurückführten (Dahl et al. 2000, Hecht 1998). Eine ähnliche Nitrosamin-abhängige Tiergewichtsreduktion konnte durch Il'nitskaya et al. bereits nach einmaliger intraperitonealer Injektion von Diethylnitrosamin gezeigt werden (Il'nitskaya et al. 2016).

6.2 Charakterisierung der Lungentumoren

6.2.1 Expression des CXCR4

Der Nachweis des Chemokinrezeptors CXCR4 in den Lungengeweben der *Cxcr4-eGFP-BAC*-Mäuse des Pilotversuchs und der *Cxcl12-Cxcl12RFP/Cxcr4-eGFP-BAC*-Mäuse des Hauptversuchs wurde mithilfe der immunhistochemischen Färbung an Paraffinschnitten und Free-Floating-Schnitten jeweils unter Verwendung des phosphosensitiven Anti-CXCR4-Antikörpers UMB-2 erbracht. Im Pilotversuch erfolgten zusätzlich die fluoreszenzmikroskopische Darstellung des CXCR4 unter Verwendung des unabhängig von der Rezeptorphosphorylierung bindenden Anti-CXCR4-Antikörpers 2B11 und die Detektion der *Cxcr4*-mRNA mithilfe der In-situ-Hybridisierung.

Der Anti-CXCR4-Antikörper UMB-2 ist gegen den unphosphorylierten C-Terminus des CXCR4 gerichtet und detektiert folglich lediglich nicht phosphorylierte CXCR4. Eine CXCL12/SDF-1-vermittelte Phosphorylierung des C-terminalen Endes des CXCR4 verhindert somit die Bindung von UMB-2. Nach der Behandlung mit LPP, die eine Dephosphorylierung phosphorylierter CXCR4 bewirkt, lassen sich dagegen sowohl unphosphorylierte als auch ehemals phosphorylierte CXCR4 nachweisen. Der unabhängig von der C-terminalen Rezeptorphosphorylierung am N-Terminus des CXCR4 bindende Anti-CXCR4-Antikörper 2B11 erwies sich im Pilotversuch im Vergleich zum UMB-2 als unspezifisch und wurde daraufhin im Hauptversuch nicht eingesetzt.

Im tumorfreien Normalgewebe der *Cxcr4-eGFP-BAC*-Mäuse im Pilotversuch waren solitäre CXCR4-exprimierende Zellen mit zytoplasmatischer und membranständiger Anfärbung im Bereich des Bronchialepithels und der Alveolarsepten feststellbar, wobei es sich am ehesten um CXCR4-exprimierende Monozyten, Makrophagen und neutrophile Granulozyten handelt. Fluoreszenzmikroskopisch konnte das Vorhandensein dieser Immunzellpopulationen durch den Nachweis der Expression entsprechender Immunzellmarker bestätigt und deren CXCR4-Expression durch das Aufzeigen einer Koexpression von CD11b, CD68 und Gr-1 mit eGFP, das in dieser transgenen Mauslinie unter Kontrolle des murinen *Cxcr4*-Promotors exprimiert wird, indirekt bewiesen werden. Mithilfe der In-situ-Hybridisierung gelang gleichermaßen die Detektion einer grobgranulären *Cxcr4*-mRNA-Expression solitärer, im Normalgewebe verteilter Zellen. In den nichtkleinzelligen Lungentumoren der *Cxcr4-eGFP-BAC*-Mäuse waren CXCR4-exprimierende Zellen unter Betonung peripherer Tumorbereiche und in unmittelbarer Nähe zu intratumoral gelegenen Gefäßen nachweisbar. Ebenso wie im tumorfreien

Normalgewebe können diese Positivitäten unter anderem auf intratumoral gelegene Immunzellen mit physiologischer CXCR4-Expression, wie Monozyten, Makrophagen und neutrophile Granulozyten, zurückgeführt werden. Die fluoreszenzmikroskopischen Ergebnisse der CD11b-, CD68- und Gr-1-Expression bestätigten das intratumorale Vorhandensein dieser Immunzellpopulationen unter Aufzeigen einer Koexpression mit eGFP. Darüber hinaus wurde eine immunhistochemisch erkennbare, nahezu vollständige Kongruenz der Expressionsmuster des CXCR4 und des CD34 unter Abzeichnung vor allem peripher gelegener kapillärer Gefäßverläufe in den Geweben der nichtkleinzelligen Lungentumoren erfasst. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse ist in der *Cxcr4-eGFP*-BAC-Mauslinie die CXCR4-Expression dieser Tumorentität nahezu vollständig mit dem intratumoralen Vorhandensein CXCR4-exprimierender Immunzellen und Endothelzellen zu erklären und somit kein Ausdruck einer CXCR4-Expression durch nichtkleinzellige Tumorzellen. In den Lungentumoren mit kleinzelliger Differenzierung erschienen lichtmikroskopisch und fluoreszenzmikroskopisch CXCR4-positive Zellen mit zytoplasmatischer und membranständiger Anfärbung und inhomogener Verteilung im Tumorgewebe, die im Unterschied zu den nichtkleinzelligen Lungentumoren nicht mit dem Vorhandensein intratumoral gelegener Immunzellen und Endothelzellen zu begründen ist. Mithilfe der In-situ-Hybridisierung konnte in den Tumorgeweben kleinzelliger Bronchialkarzinome außerdem eine feingranuläre Silberakkumulation in einer höheren Konzentration als im umliegenden Normalgewebe festgestellt und somit eine intratumorale *Cxcr4*-mRNA-Expression bestätigt werden, weshalb die CXCR4-Expression im Gewebe der kleinzelligen Lungentumoren als Ausdruck einer tumoralen Expression zu werten ist. In den nichtkleinzelligen und den kleinzelligen Lungentumoren konnte gleichermaßen eine Verstärkung des CXCR4-Immunsignals nach der Behandlung mit LPP erreicht werden.

Die *Cxcl12-Cxcl12RFP/Cxcr4-eGFP*-BAC-Mäuse im Hauptversuch zeigten analog zu den *Cxcr4-eGFP*-BAC-Mäusen des Pilotversuchs im tumorfreien Normalgewebe solitäre CXCR4-positive Zellen im Bereich des Bronchialepithels und der Alveolarsepten, wobei keine Abhängigkeit von der Behandlung mit NNK und LPS beziehungsweise NNK, LPS und AMD3100 festzustellen war. Diese Positivitäten stellen am ehesten CXCR4-exprimierende Immunzellen dar. Mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie gelang im Normalgewebe der Nachweis entsprechender Immunzellmarker sowie die Bestätigung einer Koexpression von CD11b, CD68 und Gr-1 mit eGFP, dessen

Expression in dieser transgenen Mauslinie ebenfalls unter Kontrolle des murinen *Cxcr4*-Promotors steht. In den nichtkleinzelligen Lungentumoren der *Cxcl12-Cxcl12RFP/Cxcr4-eGFP*-BAC-Mäuse wurden vor allem in peripheren Tumorbereichen CXCR4-Positivitäten nachgewiesen, die auf das intratumorale Vorhandensein von Immunzellen und Gefäßendothelzellen zurückzuführen sind. Analog zu den Ergebnissen des Pilotversuchs konnten intratumoral sowohl die immunhistochemische Kongruenz der Expression von CXCR4 und CD34 als auch die fluoreszenzmikroskopische Darstellung entsprechender Immunzellmarker mit einer eGFP-Koexpression bestätigt werden. In den Lungentumoren mit kleinzelliger Differenzierung wurden mehrheitlich CXCR4-exprimierende Zellen detektiert, die kleinzellige Tumorzellen darzustellen scheinen, da in dieser Entität kein Nachweis von Immunzellen oder Endothelzellen erbracht werden konnte. Das Ausmaß der CXCR4-Expression erwies sich in beiden Tumorentitäten als unabhängig vom angewandten Behandlungsschema, das jedoch einen Einfluss auf die Rezeptorlokalisierung des CXCR4 zeigte. In der Behandlungsgruppe mit NNK und LPS war eine zytoplasmatische Anfärbung des CXCR4 feststellbar, die in kleinzelligen Tumorzellen sogar mit deutlich abgrenzbaren zytoplasmatischen Granula erschien. Der intrazelluläre Nachweis des CXCR4 ist mit einer physiologisch erhöhten CXCL12/SDF-1-Expression durch Bildung eines *Cxcl12RFP*-Fusionsproteins unter Kontrolle des murinen *Cxcl12*-Promotors in der *Cxcl12-Cxcl12RFP/Cxcr4-eGFP*-BAC-Mauslinie und mit der CXCL12/SDF-1-vermittelten Rezeptorinternalisierung zu erklären. Die Bindung des CXCL12/SDF-1 an den CXCR4 bedingt die C-terminale Phosphorylierung sowie die Internalisierung des CXCR4, was mit einer Reduktion der membranständigen Rezeptorexpression einhergeht (Hatse et al. 2002, Neel et al. 2005). Mit dem phosphosensitiven Anti-CXCR4-Antikörper UMB-2 gelang nach der LPP-Behandlung, die zu einer Dephosphorylierung phosphorylierter CXCR4 führt, ein deutlicher Anstieg des Immunsignals. In der Behandlungsgruppe mit NNK, LPS und AMD3100 konnte lichtmikroskopisch und fluoreszenzmikroskopisch eine membranständige Anfärbung des CXCR4 aufgezeigt werden. Die Wechselwirkung des nicht-peptidischen CXCR4-Antagonisten AMD3100 mit extrazellulären Anteilen des CXCR4 verhindert die Bindung des CXCL12/SDF-1 sowie die CXCL12/SDF-1-vermittelte C-terminale Phosphorylierung und Internalisierung des CXCR4. Das Ausmaß der CXCR4-Expression zeigte keinen Unterschied in Abhängigkeit von der LPP-Behandlung, wodurch die vollständige Antagonisierung des CXCR4 durch AMD3100 bewiesen werden konnte.

6.2.2 Expression von eGFP

Die Darstellung der eGFP-Expression in den Lungengeweben der *Cxcr4-eGFP*-BAC-Mäuse und der *Cxcl12-Cxcl12RFP/Cxcr4-eGFP*-BAC-Mäuse erfolgte mithilfe der Immunhistochemie an Paraffinschnitten und Free-Floating-Schnitten sowie über die natürliche Autofluoreszenz, die aufgrund der Expression eines *eGFP*-Reportergens unter Kontrolle des murinen *Cxcr4*-Promotors in beiden transgenen Mauslinien entstand. Im tumorfreien Normalgewebe waren im Pilotversuch und im Hauptversuch gleichermaßen eGFP-positive Zellen im Bereich des Interstitiums und des Bronchialepithels feststellbar. Wie durch die Expression ausgewählter Immunzellmarker bewiesen werden konnte, stellen diese Positivitäten am ehesten CXCR4-exprimierende neutrophile Granulozyten, Monozyten und Makrophagen dar. In nichtkleinzelligen Lungentumoren erschienen unabhängig von der Tumorgröße, der transgenen Mauslinie und vom Behandlungsschema, insbesondere in peripheren Tumorarealen, eGFP-positive Zellen, die unter fluoreszenzmikroskopisch aufgezeigter Koexpression mit CD11b, CD68 und Gr-1 das Vorhandensein intratumoral gelegener CXCR4-exprimierender Immunzellen bestätigt. In den kleinzelligen Lungentumoren wurden eGFP-exprimierende Zellen im gesamten Tumorgewebe mit direkter Abhängigkeit zur Tumorgröße nachgewiesen. Da eine Koexpression mit entsprechenden Immunzellmarkern fluoreszenzmikroskopisch nicht nachweisbar war, ist im Gegensatz zu den nichtkleinzelligen Lungentumoren von einer tumoralen eGFP-Expression und damit einer CXCR4-Expression auszugehen. Die erwartungsgemäße Ähnlichkeit der Expressionsmuster des eGFP und des CXCR4 konnte im tumorfreien Normalgewebe und in den Geweben nichtkleinzelliger und kleinzelliger Lungentumoren bewiesen werden, wobei eine höhere Konzentration des eGFP in beiden transgenen Mauslinien deutlich wurde. Aufgrund einer Halbwertszeit von über 24 Stunden resultiert eine intrazelluläre Akkumulation des eGFP (Jung et al. 2000, Leveau und Lindow 2001). Die Halbwertszeit der *Cxcr4*-mRNA wird dagegen zwischen einer und zwei Stunden angegeben, weshalb der CXCR4 einem schnelleren Abbau unterliegt, was wahrscheinlich dazu geführt hat, dass das CXCR4-Immunsignal im Vergleich zu dem des eGFP niedriger war (Nagase et al. 2002, Petruzzello-Pellegrini et al. 2012).

6.2.3 Expression von CXCL12/SDF-1

Das Chemokin CXCL12/SDF-1 gilt als einziger bekannter endogener Ligand des CXCR4 und bewirkt die gerichtete Migration CXCR4-positiver Monozyten und

Makrophagen entlang des Konzentrationsgradienten zur höchsten Konzentration des CXCL12/SDF-1 (Coulomb-L'Hermin et al. 1999). Im Lungengewebe erfolgt die Expression vor allem durch Alveolarepithelzellen und Bronchialepithelzellen.

In den Lungengeweben der *Cxcr4-eGFP*-BAC-Mäuse und der *Cxcl12-Cxcl12RFP/Cxcr4-eGFP*-BAC-Mäuse wurde die Expression des CXCL12/SDF-1 an Paraffinschnitten und an Free-Floating-Schnitten untersucht. Im Normalgewebe zeigten insbesondere Bronchialepithelzellen mit bekannter CXCL12/SDF-1-Expression eine deutliche Anfärbung, die gleichermaßen sowohl lichtmikroskopisch als auch fluoreszenzmikroskopisch detektiert wurde. Nichtkleinzellige Lungentumoren wiesen immunhistochemisch unabhängig von deren Größe und vom Behandlungsschema eine erkennbare CXCL12/SDF-1-Expression in Tumorebenen mit einer geringen CXCR4-Expression auf, wohingegen ein Nachweis des CXCL12/SDF-1 in tumoralen Bereichen mit deutlicher CXCR4-Expression fast nicht möglich war. Fluoreszenzmikroskopisch gelang die Detektion vereinzelter intratumoraler Positivitäten. In kleinzelligen Lungentumoren waren ohne Abhängigkeit von deren Tumorgöße oder vom Behandlungsschema mehrheitlich keine, allenfalls vereinzelte CXCL12/SDF-1-Positivitäten feststellbar. Trotz der Expression eines *Cxcl12RFP*-Fusionsproteins unter Kontrolle des murinen *Cxcl12*-Promotors in der *Cxcl12-Cxcl12RFP/Cxcr4-eGFP*-BAC-Mauslinie im Hauptversuch konnte in den Lungengeweben dieser Versuchstiere im Vergleich zu den Lungengeweben der *Cxcr4-eGFP*-BAC-Mäuse des Pilotversuchs keine erhöhte CXCL12/SDF-1-Konzentration nachgewiesen werden. Mithilfe der In-situ-Hybridisierung gelang hingegen der Nachweis der Isoformen-übergreifenden *Cxcl12/SDF-1*-mRNA im Bereich kleinzelliger Lungentumoren. Eine im Vergleich zum umliegenden Normalgewebe höhere mRNA-Konzentration der CXCL12/SDF-1-Isoformen *SDF-1 α* , *SDF-1 β* und *SDF-1 γ* konnte nicht nachgewiesen werden.

Das inverse Expressionsmuster des CXCL12/SDF-1 und des CXCR4 entsteht am ehesten aufgrund der Epitopstruktur des Anti-CXCL12/SDF-1-Antikörpers mit der Klonbezeichnung 79018, der den Bereich zwischen dem N-terminalen Lysin 22 und dem Lysin 89 am C-terminalen Ende bindet. Der N-terminale Bereich des CXCL12/SDF-1 ist unter Einbeziehung des Lysins 22 an der elektrostatischen Interaktion mit dem N-Terminus des CXCR4 beteiligt (Xu et al. 2013). Eine Wechselwirkung zwischen dem CXCL12/SDF-1 und dem CXCR4 unter anderem in CXCR4-positiven Tumorebenen bewirkt daher wohl eine verminderte Bindungsfähigkeit dieses Anti-CXCL12/SDF-1-Antikörpers einhergehend mit einer fehlenden CXCL12/SDF-1-Darstellung.

6.2.4 Expression ausgewählter Immunzellmarker

Die Untersuchung der Expression ausgewählter Immunzellmarker zur weiteren Charakterisierung der CXCR4-positiven Zellen im Normalgewebe und in den Tumorgeweben nichtkleinzelliger und kleinzelliger Lungentumoren diente insbesondere der Unterscheidung CXCR4-exprimierender Tumorzellen von intratumoral gelegenen, CXCR4-exprimierenden Immunzellen. Die Darstellung der Expression von CD11b, CD31, CD68 und Gr-1 erfolgte im Pilotversuch und im Hauptversuch ausschließlich fluoreszenzmikroskopisch an Free-Floating-Schnitten.

Als Bestandteil des heterodimeren Proteinkomplexes Mac-1 (englisch: Macrophage-1-antigen) ist CD11b gemeinsam mit CD18 an der Phagozytose, der Zell-Zell-Interaktion, der Zelladhäsion, der transendothelialen Migration und der Extravasation von Immunzellen beteiligt (Christensen et al. 2001, Tan et al. 2000). Monozyten, neutrophile Granulozyten, peritoneale B-Zell-Populationen, CD8-positive dendritische Zellen, NK-Zellen und CD8-positive T-Zell-Populationen weisen physiologischerweise eine CD11b-Expression auf (Christensen et al. 2001, McFarland et al. 1992). Durch die LPS-vermittelte Aktivierung von Immunzellen ist die Expression von CD11b auf Monozyten und neutrophilen Granulozyten nachweislich induzierbar (Gomes et al. 2010). Die *Cxcr4-eGFP*-BAC-Mäuse und die *Cxcl12-Cxcl12RFP/Cxcr4-eGFP*-BAC-Mäuse zeigten im gesunden, tumorfreen Lungengewebe im Bereich der Bronchien, der Bronchiolen, der Alveolarsepten und des Bronchialepithels CD11b-exprimierende Immunzellen unter Bestätigung einer deutlichen Koexpression von CD11b mit eGFP. Die Koexpression mit eGFP unter Kontrolle des murinen *Cxcr4*-Promotors beweist somit indirekt das Vorhandensein einer CXCR4-Expression dieser Immunzellen, wobei eine Unterscheidung einzelner Subpopulationen auf der Grundlage der Expression von CD11b nicht möglich ist. In den Lungengeweben der *Cxcl12-Cxcl12RFP/Cxcr4-eGFP*-BAC-Mäuse im Hauptversuch konnten, verglichen mit den Gewebeschnitten der *Cxcr4-eGFP*-BAC-Mäuse im Pilotversuch, mehr CD11b-Positivitäten festgestellt werden. Nichtkleinzellige und kleinzellige Lungentumoren wiesen intratumoral unabhängig vom Behandlungsschema und von deren Größe gleichermaßen lediglich vereinzelte, mitunter in Gruppen zusammenliegende CD11b-positive Zellen auf, die am ehesten intratumoral gelegenen Immunzellen entsprechen. Diese CD11b-exprimierenden Zellen zeigten eine eGFP-Koexpression, die indirekt das intratumorale Vorhandensein von Immunzellen mit physiologischer CXCR4-Expression bestätigt.

Das transmembranäre Glykoprotein CD31, das auch als PECAM-1 (englisch: Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1) bezeichnet wird, ist ein histopathologischer Marker für Endothelzellen. Auf endothelialen Zellen konnte von der Arbeitsgruppe um Müller et al. eine starke homogene Expression von CD31 nachgewiesen werden, die im Unterschied zur CD34-Expression keiner Gefäßspezifität unterliegt und an der interzellulären Verbindung zwischen Endothelzellen beteiligt ist (Müller et al. 2002b). Neben endothelialen Zellen bilden unter anderem auch zirkulierende Thrombozyten, Monozyten, neutrophile Granulozyten und bestimmte T-Zell-Populationen CD31 (McKenney et al. 2001, Müller et al. 2002b). Die funktionelle Bedeutung des CD31 beruht auf dessen Beteiligung an der endothelialen Zell-Zell-Verbindung und der Angiogenese sowie an der Entzündungs-vermittelten Adhäsion und Migration von Leukozyten (McKenney et al. 2001).

In den tumorfreen Normalgeweben der *Cxcr4-eGFP*-BAC-Mäuse sowie der *Cxcl12-Cxcl12RFP/Cxcr4-eGFP*-BAC-Mäuse konnten CD31-Positivitäten unter deutlicher Abzeichnung von Bronchien, Bronchiolen und Alveolarsepten dargestellt werden. Die Lungengewebe der *Cxcl12-Cxcl12RFP/Cxcr4-eGFP*-BAC-Mäuse im Hauptversuch wiesen dabei eine deutlich höhere Konzentration CD31-exprimierender Zellen auf, was durch die erhöhte CXCL12/SDF-1-Expression mit CXCL12/SDF-1-vermittelter zielgerichteter Migration CXCR4-exprimierender Immunzellen in dieser transgenen Mauslinie begründet werden kann. Neben einer endothelialen CD31-Expression von in den Alveolarsepten liegenden Kapillaren und von im subepithelialen Bindegewebe von Bronchien und Bronchiolen gelegenen Blutgefäßen ist dies also auch auf die LPS-induzierte und CXCL12/SDF-1-vermittelte Entzündungszellinfiltration des Lungengewebes mit CD31-exprimierenden Immunzellen zurückzuführen. Eine Unterscheidung von CD31-positiven Endothelzellen und Immunzellen ist dabei aber ausschließlich morphologisch möglich. Die Arbeitsgruppe Pusztaszeri et al. erbrachte den Nachweis einer CD31-Expression von Alveolarkapillaren und von Alveolarmakrophagen in immunhistochemisch gefärbten humanen Lungengewebsschnitten (Pusztaszeri et al. 2006). In den Geweben nichtkleinzelliger und kleinzelliger Lungentumoren waren in der vorliegenden Arbeit unabhängig vom Behandlungsschema und von deren Größe allenfalls vereinzelt CD31-positive Zellen nachweisbar. In nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen konnten intratumorale, deutlich CD31-positive Gefäßanschnitte dargestellt werden. Vereinzelte solitäre Positivitäten innerhalb der Tumorgewebe sind am ehesten auf die CD31-Expression von Immunzellen zurückzuführen (McKenney et al. 2001).

Das murine transmembranäre Glykoprotein CD68, das ebenfalls unter der Bezeichnung Macrosialin bekannt ist, hat sich als histopathologischer und selektiver Marker in der immunhistochemischen Darstellung von Monozyten und Makrophagen bewährt. Neben Monozyten und Makrophagen zeigen auch andere Zelllinien des retikulo-histiozytären Systems, wie unter anderem Zellen der Mikroglia, dendritische Zellen und Osteoklasten, eine CD68-Expression mit einem zellspezifischen Expressionsmuster (Chistiakov et al. 2017, Gottfried et al. 2008). Der Nachweis kann bei Makrophagen nicht nur auf der Zelloberfläche, sondern hauptsächlich intrazellulär im Endosomen- und Lysosomen-Kompartiment erbracht werden, wobei intrazellulär gelegene und auf der Außenmembran exprimierte CD68-Glykoproteine einem ständigen Austausch unterliegen (Chistiakov et al. 2017). Funktionell ist CD68 an der Bindung und Internalisierung von oxidiertem LDL (englisch: Low Density Lipoprotein) sowie höchstwahrscheinlich an der Antigenprozessierung beteiligt (Chistiakov et al. 2017, Kurushima et al. 2000).

Die Ausprägung der CD68-Expression in den tumorfreen Normalgeweben erwies sich in Abhängigkeit von der transgenen Mauslinie als auffallend verschieden. Im Lungengewebe der *Cxcr4-eGFP*-BAC-Mäuse im Pilotversuch konnten CD68-positive Zellen vor allem im Bereich des Bronchialepithels festgestellt werden, wohingegen in den *Cxcl12-Cxcl12RFP/Cxcr4-eGFP*-BAC-Mäusen im Hauptversuch zahlreiche CD68-Positivitäten unter Abzeichnung der Alveolarsepten, der Bronchialepithelien und der tumornahen Normalgewebsbereiche nachgewiesen wurden. Hierdurch bestätigte sich das Vorhandensein CD68-positiver Monozyten und Makrophagen in den Lungengeweben beider transgenen Mauslinien. Im Normalgewebe der *Cxcl12-Cxcl12RFP/Cxcr4-eGFP*-BAC-Mäuse, die physiologischerweise eine erhöhte Expression des CXCL12/SDF-1 aufweisen, wurde darüber hinaus der Nachweis einer massiven, LPS-induzierten und CXCL12/SDF-1-vermittelten Infiltration mit CD68-exprimierenden Monozyten und Makrophagen erbracht. In den nichtkleinzelligen und kleinzelligen Lungentumoren gelang insbesondere in peripheren, dem Normalgewebe anliegenden Tumorbereichen gleichermaßen die Darstellung einer intratumoralen CD68-Expression unabhängig von der Tumorgroße, der transgenen Mauslinie und dem angewandten Behandlungsschema. Neben einer nachweislichen Infiltration der Tumorgewebe mit CD68-positiven Monozyten und Makrophagen war mitunter eine Koexpression mit eGFP feststellbar, die indirekt eine CXCR4-Expression dieser CD68-exprimierenden Zellen bestätigt.

Der monoklonale Anti-Gr-1-Antikörper 1A8-Ly6G ist gegen das Glykoprotein Ly6G des Oberflächenproteins Gr-1 (englisch: Granulocyte-differentiation antigen-1) gerichtet, das epitope Strukturen der Glykoproteine Ly6C und Ly6G der Ly6-Superfamilie (englisch: Lymphocyte antigen 6) enthält (Lee et al. 2013). Als Oberflächenmarker zur Unterscheidung verschiedener Leukozytenpopulationen wird Gr-1 von neutrophilen Granulozyten und vorübergehend von Monozyten während deren Differenzierung im Knochenmark exprimiert (Serafini et al. 2004). Ly6G stellt einen selektiven Marker für murine neutrophile Granulozyten dar, weshalb der Antikörper 1A8-Ly6G dem selektiven Nachweis neutrophiler Granulozyten dient und negativ gegenüber Monozyten und Makrophagen reagiert. Im Mausmodell konnte eine 1A8-Ly6G-vermittelte selektive Depletion muriner neutrophiler Granulozyten erreicht werden (Daley et al. 2008). Die Funktion des Glykoproteins Ly6G ist noch nicht vollständig verstanden, es scheint aber an der Migration neutrophiler Granulozyten mitzuwirken (Lee et al. 2013). Im tumorfreien Normalgewebe der *Cxcr4-eGFP*-BAC-Mäuse im Pilotversuch und der *Cxcl12-Cxcl12RFP/Cxcr4-eGFP*-BAC-Mäuse im Hauptversuch erschienen gleichermaßen Gr-1-positive Zellen, die im Gegensatz zu der Expression von CD11b und CD68 keine bevorzugte Lokalisation im Bereich des Bronchialepithels aufwiesen. Trotz der physiologischerweise erhöhten Expression des CXCL12/SDF-1 in der *Cxcl12-Cxcl12RFP/Cxcr4-eGFP*-BAC-Mauslinie, einhergehend mit der CXCL12/SDF-1-vermittelten Migration CXCR4-exprimierender Immunzellen, konnte im Unterschied zur Expression von CD11b, CD31 und CD68 keine erhöhte Anzahl Gr-1-exprimierender Immunzellen in den Lungengewebe der *Cxcl12-Cxcl12RFP/Cxcr4-eGFP*-BAC-Mäuse nachgewiesen werden. Dadurch wurde im Lungengewebe unabhängig von der transgenen Mauslinie das Vorhandensein neutrophiler Granulozyten mit physiologischer Gr-1-Expression bewiesen, bei denen darüber hinaus indirekt unter Aufzeigen einer deutlichen eGFP-Koexpression eine CXCR4-Expression bestätigt werden konnte. In den Geweben nichtkleinzelliger und kleinzelliger Lungentumoren wurden ebenso Gr-1-positive Zellen mit auffallender eGFP-Koexpression festgestellt, ohne dass hierbei ein charakteristisches Expressionsmuster oder eine Abhängigkeit von der transgenen Mauslinie oder dem Behandlungsschema nachweisbar waren. Die vergleichsweise höhere Anzahl an Gr-1-Positivitäten in nichtkleinzelligen Lungentumoren ist am ehesten mit deren größeren Tumorausdehnung zu erklären. Die intratumorale Lage neutrophiler Granulozyten mit physiologischer Expression des Gr-1 und des CXCR4 konnte somit bewiesen werden.

6.2.5 Expression von CD34

Das transmembranäre Glykoprotein CD34 stellt in der Histopathologie einen diagnostischen Marker für endotheliale Zellen dar. Es wird luminal von makrovaskulären und mikrovaskulären Endothelzellen exprimiert. Die höchste CD34-Expression lässt sich auf der Oberfläche kapillärer Endothelzellen und insbesondere auf neugeformten Gefäßsprossen, gefolgt von Arterien, Venen, Arteriolen und Venolen, nachweisen (Müller et al. 2002a, Müller et al. 2002b). In Zellkulturen konnte außerdem eine endotheliale Expression von CXCR4 aufgezeigt werden, was eine Koexpression von CD34 und CXCR4 vermuten lässt (Salcedo et al. 1999). Neben einer gefäßspezifischen Expression erweisen sich auch hämatopoetische Stammzellen, deren Vorläuferzellen, embryonale Fibroblasten und Fibroblasten des Knochenmarks als CD34-positiv. Der CD34-Expression durch Blutgefäßendothelien wird aufgrund der Beteiligung an der Leukozytenadhäsion eine besondere Bedeutung zugemessen (Lin et al. 1995).

Die *Cxcr4-eGFP*-BAC-Mäuse im Pilotversuch sowie die *Cxcl12-Cxcl12RFP/Cxcr4-eGFP*-BAC-Mäuse im Hauptversuch zeigten im tumorfreien Normalgewebe gleichermaßen endotheliale CD34-Positivitäten in Anschnitten pulmonaler Kapillaren, vor allem in der Nähe von Bronchien, Bronchiolen und Alveolarsepten und in unmittelbarer Tumorumgebung. Dies wurde durch die immunhistochemische Färbung an Paraffinschnitten und an Free-Floating-Schnitten bewiesen. In den Geweben nichtkleinzelliger Lungentumoren ergab sich eine endotheliale Expression von CD34 unter Abzeichnung überwiegend peripher, aber auch zentral im Tumor gelegener kapillärer Gefäßverläufe, die insbesondere fluoreszenzmikroskopisch dargestellt werden konnten. Die bei der immunhistochemischen Färbung sowohl im Pilotversuch als auch im Hauptversuch aufgezeigte Kongruenz dieser intratumoralen CD34-Expression mit der CXCR4-Expression nichtkleinzelliger Lungentumoren beweist das Vorhandensein einer Koexpression von CD34 und CXCR4 durch intratumorale Gefäßendothelzellen. In den kleinzelligen Bronchialkarzinomen konnte in beiden transgenen Mauslinien sowohl in der lichtmikroskopischen als auch in der fluoreszenzmikroskopischen Darstellung kein Nachweis einer intratumoralen CD34-Expression erbracht werden. Im Unterschied zu den nichtkleinzelligen Lungentumoren scheinen kleinzellige Bronchialkarzinome in diesem frühen Tumorstadium und bei einer vergleichsweise geringeren Tumorgroße keine intratumorale Vaskularisation aufzuweisen. In unmittelbarer Tumorumgebung gelegene Blutgefäße zeigten allerdings in jedem Fall eine deutliche CD34-Expression.

6.2.6 Expression von Chromogranin A

Als einer der Hauptvertreter der so genannten Granin-Familie gilt das Polypeptid Chromogranin A als bedeutender Tumormarker in der Diagnostik neuroendokriner Tumoren. Nach der Synthese im rauen endoplasmatischen Retikulum erfolgt typischerweise die Speicherung als Prohormon in den Sekretgranula neuroendokriner (Tumor-)Zellen. Dies ermöglicht die Identifizierung spezifischer Tumoren mit sekretorischen Eigenschaften anhand des Nachweises von Chromogranin A und darüber hinaus auch die Beurteilung der Malignität und des Metastasierungspotentials (Bartolomucci et al. 2011). Insbesondere beim kleinzelligen Bronchialkarzinom gelingt mehrheitlich ein Nachweis neuroendokriner Tumormarker. Ein negativer Befund findet sich hierbei lediglich in unter 10 % der Fälle (Travis et al. 2004). Auch im Vergleich zu nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen lassen sich in kleinzelligen Bronchialkarzinomen höhere Level an Chromogranin A aufzeigen. Im gesunden Lungengewebe wird Chromogranin A insbesondere von pulmonalen neuroendokrinen Zellen des diffusen neuroendokrinen Systems exprimiert, von denen das kleinzellige Bronchialkarzinom auszugehen scheint (Modlin et al. 2010, Sayeg et al. 2014).

Die Untersuchung der Expression von Chromogranin A in den Lungengeweben der *Cxcr4-eGFP*-BAC-Mäuse sowie der *Cxcl12-Cxcl12RFP/Cxcr4-eGFP*-BAC-Mäuse erfolgte ausschließlich an Paraffinschnitten. In den tumorfreien Normalgeweben waren lediglich vereinzelt Chromogranin A-exprimierende Zellen mit starker zytoplasmatischer Anfärbung nachweisbar, die am ehesten pulmonale neuroendokrine Zellen darstellen. Die mäßige Anfärbung der Bronchialepithelien ist als unspezifische Hintergrundfärbung im Sinne einer Überfärbung zu werten. Lungentumoren mit nichtkleinzelliger Differenzierung zeigten vereinzelt Chromogranin A-Positivitäten mit starker zytoplasmatischer Anfärbung und bevorzugter Lokalisation in peripheren Tumorebenen. Dies bestätigt möglicherweise das intratumorale Vorhandensein von pulmonalen neuroendokrinen Zellen oder von Tumorebenen mit kleinzelliger Differenzierung. Die mäßige Anfärbung peripherer Tumorbereiche ist wiederum als unspezifische Hintergrundfärbung zu werten. Die höchste Konzentration an Chromogranin A-exprimierenden Zellen mit deutlicher zytoplasmatischer Anfärbung konnte erwartungsgemäß in kleinzelligen Lungentumoren mit direkter Abhängigkeit von der Tumorgroße nachgewiesen werden, wodurch der Nachweis des neuroendokrinen Tumormarkers Chromogranin A in dieser Tumorentität erbracht wurde.

6.2.7 Expression von Ki-67

Die Unterscheidung von proliferierenden und nicht-proliferierenden Zellen eines Gewebes sowie die Differenzierung zwischen gesunden Geweben und Tumoren sind von diagnostischer und klinischer Bedeutung. Als Proliferationsmarker zur Detektion sich teilender Zellen hat sich das Protein Ki-67, dessen Expression eng mit der Zellproliferation verknüpft ist, in der histopathologischen Diagnostik bewährt (Giroud und Montmasson 2013). Der Nachweis des Proteins Ki-67 ist im Zellkern und im Nukleolus in allen aktiven Phasen des Zellzyklus (G1-, S-, G2-, M-Phase) möglich, misslingt hingegen bei ruhenden Zellen innerhalb der G0-Phase. Aus diesem Grund kann die Wachstumsfraktion einer Zellpopulation mithilfe des Ki-67-Proteins bestimmt werden, auch wenn es lediglich Informationen über den Stand der Proliferation, nicht aber über die Proliferationsrate ermöglicht (Scholzen und Gerdes 2000). Der Anteil Ki-67-positiver Tumorzellen korreliert außerdem häufig mit dem Krankheitsprogress und hat somit auch einen prognostischen Aussagewert.

Die Lungengewebe der *Cxcr4-eGFP-BAC*-Mäuse im Pilotversuch sowie der *Cxcl12-Cxcl12RFP/Cxcr4-eGFP-BAC*-Mäuse im Hauptversuch wurden lichtmikroskopisch und fluoreszenzmikroskopisch auf das Vorhandensein Ki-67-exprimierender Zellen untersucht. Bronchialepithelzellen und Alveolarepithelzellen, die zwar physiologischerweise einer erhöhten Teilungsaktivität unterliegen, zeigten mehrheitlich keine Ki-67-Anfärbung der Zellkerne. Infolge der durch LPS induzierten Entzündungszellinfiltration, einhergehend mit der Freisetzung reaktiver Sauerstoffverbindungen und Stickstoffverbindungen sowie proteolytischer Enzyme, können die Ki-67-Positivitäten im Normalgewebe als Ausdruck aktiver Reparaturprozesse verstanden werden. In den nichtkleinzelligen Lungentumoren konnten immunhistochemisch und fluoreszenzmikroskopisch unabhängig von deren Größe lediglich vereinzelt Ki-67-positive Tumorzellen aufgezeigt werden, die auf eine geringe Teilungsaktivität dieser Tumorentität hindeuten. Diese Positivitäten waren insbesondere in peripheren Proliferationsfronten und kleinzelligen Tumoranteilen feststellbar. Die mäßige Anfärbung des Proliferationsmarkers Ki-67 in der immunhistochemischen Darstellung peripherer, nichtkleinzelliger Tumorbereiche ist am ehesten mit einer unspezifischen Hintergrundfärbung des verwendeten Anti-Ki-67-Antikörpers zu erklären. Kleinzellige Lungentumoren zeigten im Vergleich zu den nichtkleinzelligen Tumoren unabhängig vom Behandlungsschema und von der transgenen Mauslinie eine höhere Teilungsaktivität mit teils deutlicher

Ki-67-Expression. Das variable Ki-67-Expressionsmuster als Ausdruck einer unterschiedlichen Mitoserate mit dem Aufzeigen einer fehlenden oder lediglich vereinzelter Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 von Tumorzellen kleinzelliger Bronchialkarzinome ist durch das frühe Tumorstadium zu erklären. Ein Einfluss des CXCR4-Antagonisten AMD3100 auf die Teilungsaktivität nichtkleinzelliger und kleinzelliger Lungentumoren der *Cxcl12RFP/Cxcr4-eGFP*-BAC-Mäuse konnte nicht verzeichnet werden.

6.2.8 Expression des SSTR2

Der Somatostatin-Rezeptor SSTR2 ist einer von insgesamt fünf bekannten Somatostatin-Rezeptoren, die der Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren mit sieben membrandurchspannenden Helices angehören, und kommt in zwei Spleißvarianten vor (Olias et al. 2004). Eine membranständige SSTR2-Expression konnte insbesondere in neuroendokrinen Tumoren der Lunge nachgewiesen werden (Kaemmerer et al. 2015, Reubi et al. 2001).

Die Darstellung der SSTR2-Expression in den Lungengeweben der *Cxcr4-eGFP*-BAC-Mäuse im Pilotversuch und der *Cxcl12-Cxcl12RFP/Cxcr4-eGFP*-BAC-Mäuse im Hauptversuch wurde ausschließlich an Paraffinschnitten erbracht. Im tumorfreien Normalgewebe der *Cxcr4-eGFP*-BAC-Mäuse gelang vereinzelt der Nachweis SSTR2-positiver Bronchialepithelzellen, wohingegen die Normalgewebszellen der *Cxcl12-Cxcl12RFP/Cxcr4-eGFP*-BAC-Mäuse vollständig SSTR2-negativ erschienen. In den nichtkleinzelligen Lungentumoren der *Cxcr4-eGFP*-BAC-Mauslinie konnten einige wenige SSTR2-exprimierende Zellen mit mäßiger Anfärbung festgestellt werden. Die kleinzelligen Lungentumoren der *Cxcr4-eGFP*-BAC-Mauslinie sowie die Lungentumoren mit nichtkleinzelliger und kleinzelliger Differenzierung der *Cxcl12-Cxcl12RFP/Cxcr4-eGFP*-BAC-Mauslinie erwiesen sich hingegen als vollständig SSTR2-negativ. Die vereinzelter Positivitäten im Normalgewebe und im Tumorgewebe sind dabei am ehesten als Ausdruck einer unspezifischen Anfärbung zu werten. Eine unter anderem von den Arbeitsgruppen um Kaemmerer et al. und Reubi et al. beschriebene SSTR2-Expression durch kleinzellige Lungentumorzellen konnte nicht bestätigt werden (Kaemmerer et al. 2015, Reubi et al. 2001). Dies ist möglicherweise mit dem sehr frühen Tumorstadium oder einer physiologischerweise fehlenden SSTR2-Expression in NNK- und LPS-induzierten Tumoren zu erklären.

6.3 Antagonisierung des CXCR4 durch AMD3100

AMD3100 (Plerixafor) ist als nicht-peptidischer CXCR4-Antagonist der spezifischen Bindung des Chemokinrezeptors CXCR4 fähig. Aufgrund der im physiologischen pH-Bereich durch Protonierung der Cyclam-Ringstrukturen entstehenden positiven Ladungen besteht die Möglichkeit einer spezifischen Wechselwirkung zwischen AMD3100 und negativ geladenen Aminosäuren extrazellulär gelegener Anteile des CXCR4 (Fricker 2013, Fricker et al. 2006, Wong et al. 2008). Die Bindung von AMD3100 an CXCR4 inhibiert die Wechselwirkung mit dessen natürlichen Liganden CXCL12/SDF-1 und damit einhergehend die CXCL12/SDF-1-vermittelte Phosphorylierung des C-Terminus und die Aktivierung des CXCR4 (Hatse et al. 2002). Einen Indikator für das Ausmaß der CXCR4-Aktivierung durch CXCL12/SDF-1 bildet hierbei die C-terminale Phosphorylierung. Der Anti-CXCR4-Antikörper UMB-2 ist gegen den unphosphorylierten C-Terminus des CXCR4 gerichtet. Ohne eine entsprechende Behandlung mit LPP, die eine Dephosphorylierung der phosphorylierten C-Termini bewirkt, werden durch UMB-2 also lediglich unphosphorylierte, nicht aktivierte CXCR4 nachgewiesen. Erfolgt hingegen eine LPP-Behandlung, gelingt die Darstellung von dephosphorylierten und unphosphorylierten, also durch den endogenen CXCR4-Liganden CXCL12/SDF-1 aktivierten und nicht aktivierten, Rezeptoren. Im direkten Vergleich der CXCR4-Expression unter Verwendung des phosphosensitiven Anti-CXCR4-Antikörpers UMB-2 ohne und mit LPP-Behandlung kann somit die Konzentration aktivierter CXCR4 im Verhältnis zur Gesamtkonzentration des CXCR4 abgeschätzt werden (Mueller et al. 2013).

Der Chemokinrezeptor CXCR4 ist physiologischerweise an der gerichteten Migration CXCR4-exprimierender Zellen, an der Angiogenese und der Vaskularisation sowie an der Proliferation und dem Zellüberleben beteiligt, weshalb einer tumoralen CXCR4-Expression eine Beteiligung an der Metastasierung, der Invasivität, dem Tumorwachstum und der Chemotherapieresistenz zugeschrieben wird (Chatterjee et al. 2014, Furusato et al. 2010, Nagasawa 2014).

Alle der zusätzlich mit AMD3100 behandelten *Cxcl12-Cxcl12RFP/Cxcr4-eGFP-BAC*-Mäuse wiesen nach erfolgter Tumorinduktion nichtkleinzellige und kleinzellige Lungentumoren auf, die sich in deren Anzahl oder deren Größe nicht von denen der lediglich mit NNK und LPS behandelten *Cxcl12-Cxcl12RFP/Cxcr4-eGFP-BAC*-Mäuse unterschieden. Die CXCR4-Darstellung ohne und mit LPP-Behandlung ergab bei den mit

AMD3100 behandelten *Cxcl12-Cxcl12RFP/Cxcr4-eGFP-BAC*-Mäusen keinen Unterschied in der Ausprägung der CXCR4-Expression, wodurch das Vorliegen einer C-terminalen Phosphorylierung des CXCR4 bei diesen Tieren ausgeschlossen werden kann. Hiermit wurde der Nachweis der vollständigen Antagonisierung der CXCR4/CXCL12-Interaktion sowie der CXCL12/SDF-1-vermittelten Phosphorylierung und Rezeptoraktivierung durch AMD3100 erbracht.

Eine mit der Inhibition CXCR4-vermittelter Funktionen einhergehende Reduktion der Proliferationsrate, der Tumorgröße oder der Tumervaskularisation konnte hingegen nicht bestätigt werden. Weder in der Expression des Proliferationsmarkers Ki-67, noch in der CD34-Expression unter Darstellung von Gefäßendothelien unterschieden sich die Behandlungsgruppen mit NNK und LPS beziehungsweise NNK, LPS und AMD3100 im Hauptversuch. Ferner scheint die Bedeutung der CXCR4-vermittelten Tumervaskularisation eine Abhängigkeit vom angewandten Lungentumor-Modell aufzuweisen. In immungeschwächte Empfängertiere im Rahmen eines Xenograft-Modells injizierte humane Tumorzellen sind dabei eher auf eine umgehende Vaskularisation angewiesen, als ohnehin in unmittelbarer Nähe zu Blutgefäßen entstehende Lungentumoren in einem chemisch induzierten Lungentumor-Modell.

Die Aufhebung der Wechselwirkung zwischen CXCR4-exprimierenden Tumorzellen und dem sie umgebenden Tumormikromilieu durch AMD3100 sowie die dadurch möglicherweise erhöhte Sensibilisierung gegenüber einer chemotherapeutischen Behandlung kann durch die Ergebnisse dieser Arbeit jedoch nicht beurteilt werden.

7 Schlussfolgerungen

Das von Keohavong et al. (2011) erstmals beschriebene chemisch induzierte, murine Lungentumor-Modell erwies sich als zuverlässiges tierexperimentelles Modell. Auf der Basis einer Lipopolysaccharid-vermittelten chronischen Entzündungsreaktion des Lungengewebes gelang mithilfe des vom Nikotin abgeleiteten Nitrosamin-Ketons NNK eine realitätsnahe Nachbildung der Pathogenese des Bronchialkarzinoms sowie des mehrstufigen Prozesses der Lungentumorbildung. Nach erfolgter Behandlung mit NNK und dem Lipopolysaccharid gramnegativer Bakterien konnten in den Lungengeweben aller Behandlungstiere der *Cxcr4-eGFP*-BAC-Mauslinie im Pilotversuch und der *Cxcl12-Cxcl12RFP/Cxcr4-eGFP*-BAC-Mauslinie im Hauptversuch gleichermaßen Lungentumoren mit nichtkleinzelliger und kleinzelliger Differenzierung festgestellt werden. Eine von zwölf lediglich mit LPS behandelten *Cxcr4-eGFP*-BAC-Mäusen entwickelte ebenfalls ein kleinzelliges Bronchialkarzinom infolge einer durch die chronische Entzündungsreaktion vermittelten Schädigung des Lungengewebes, wodurch die Möglichkeit einer allein LPS-induzierten Lungentumorbildung bewiesen wurde. Unabhängig vom angewandten Behandlungsschema führte die Gabe von LPS zu einer peribronchialen und perivaskulären Entzündungszellinfiltration mit Monozyten, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten. Die unbehandelten Kontrolltiere beider transgenen Mauslinien zeigten hingegen keine Lungentumorbildung, wodurch eine spontane Tumorentwicklung ohne vorhergehende chemische Induktion erfolgreich ausgeschlossen werden konnte. Entsprechend den Zielstellungen dieser Dissertation stellt das NNK- und LPS-induzierte, murine Lungentumor-Modell somit eine geeignete tierexperimentelle Grundlage für die Suche nach neuen Zielstrukturen für die Diagnostik und die Therapie maligner Lungentumoren dar.

Die Charakterisierung der CXCR4-Expression in den chemisch induzierten nichtkleinzelligen und kleinzelligen Lungentumorgeweben erbrachte als weiteres Ergebnis den Nachweis intratumoral gelegener CXCR4-positiver Zellen. Die CXCR4-Expression innerhalb der Lungentumoren mit nichtkleinzelliger Differenzierung konnte dabei vollständig auf das intratumorale Vorhandensein von CXCR4-exprimierenden Endothelzellen und Immunzellen, vor allem von Monozyten, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten, zurückgeführt werden und ist nicht mit einer tumoralen Expression dieses Chemokinrezeptors zu erklären. In den Tumorgeweben kleinzelliger Lungentumoren wurden hingegen keine CXCR4-positiven Endothelzellen und allenfalls ver-

106

8 Literatur- und Quellenverzeichnis

- Akopyan G, Bonavida B. 2006. Understanding tobacco smoke carcinogen NNK and lung tumorigenesis. *Int J Oncol*, 29 (4):745-752.
- Allen SJ, Crown SE, Handel TM. 2007. Chemokine: Receptor Structure, Interactions, and Antagonism. *Annu Rev Immunol*, 25:787-820.
- Bartolomucci A, Possenti R, Mahata SK, Fischer-Colbrie R, Loh YP, Salton SR. 2011. The extended granin family: structure, function, and biomedical implications. *Endocr Rev*, 32 (6):755-797.
- Bhattacharyya BJ, Banisadr G, Jung H, Ren D, Cronshaw DG, Zou Y, Miller RJ. 2008. The Chemokine Stromal Cell-Derived Factor-1 Regulates GABAergic Inputs to Neural Progenitors in the Postnatal Dentate Gyrus. *J Neurosci*, 28 (26): 6720-6730.
- Brambilla E, Pugatch B, Geisinger K, Gal A, Sheppard MN, Guinee DG, Jiang SX, Lantuejoul S, Chang YL, Petersen I, Meyerson M, Hanash SM, Noguchi M. 2004. Large cell carcinoma. In: Travis WD, Brambilla E, Müller-Hermelink HK, Harris CC, Hrsg. *World Health Organization Classification of Tumours Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart*. Lyon: IARC Press, 45-50.
- Carraresi L, Tripodi SA, Mulder LC, Bertini S, Nuti S, Schuerfeld K, Cintonino M, Bensi G, Rossini M, Mora M. 2001. Thymic hyperplasia and lung carcinomas in a line of mice transgenic for keratin 5-driven HPV16 E6/E7 oncogenes. *Oncogene*, 20 (56):8148-8153.
- Chatterjee S, Behnam Azad B, Nimmagadda S. 2014. The Intricate Role of CXCR4 in Cancer. *Adv Cancer Res*, 124:31-82.
- Chistiakov DA, Killingsworth MC, Myasoedova VA, Orekhov AN, Bobryshev YV. 2017. CD68/macrosialin: not just a histochemical marker. *Lab Invest*, 97 (1): 4-13.

- Christensen JE, Andreasen SO, Christensen JP, Thomsen AR. 2001. CD11b expression as a marker to distinguish between recently activated effector CD8+ T cells and memory cells. *Int Immunol*, 13 (4):593-600.
- Colby TV, Noguchi M, Henschke C, Vazquez MF, Geisinger K, Yokose T, Ohori P, Rami-Porta R, Franks T, Shimosato Y, Matsuno Y, Khor A, Westra WH, Jambhekar NA, Petersen I, Takahashi T, Kawai T, Meyerson M, Hanash SM, Jen J. 2004. Adenocarcinoma. In: Travis WD, Brambilla E, Müller-Hermelink HK, Harris CC, Hrsg. *World Health Organization Classification of Tumours Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart*. Lyon: IARC Press, 35-44.
- Coulomb-L'Hermin A, Amara A, Schiff C, Durand-Gasselín I, Foussat A, Delaunay T, Chaouat G, Capron F, Ledee N, Galanaud P, Arenzana-Seisdedos F, Emilie D. 1999. Stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) and antenatal human B cell lymphopoiesis: expression of SDF-1 by mesothelial cells and biliary ductal plate epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96 (15):8585-8590.
- Dahl AR, Grossi IM, Houchens DP, Scovell LJ, Placke ME, Imondi AR, Stoner GD, De Luca LM, Wang D, Mulshine JL. 2000. Inhaled Isotretinoin (13-cis Retinoic Acid) Is an Effective Lung Cancer Chemopreventive Agent in A/J Mice at Low doses: A Pilot Study. *Clin Cancer Res*, 6 (8):3015-3024.
- Daley JM, Thomay AA, Connolly MD, Reichner JS, Albina JE. 2008. Use of Ly6G-specific monoclonal antibody to deplete neutrophils in mice. *J Leukoc Biol*, 83 (1):64-70.
- De Clercq E. 2015. AMD3100/CXCR4 Inhibitor. *Front Immunol*, 6:276.
- de Seranno S, Meuwissen R. 2010. Progress and applications of mouse models for human lung cancer. *Eur Respir J*, 35 (2):426-443.
- DiPersio JF, Uy GL, Yasothan U, Kirkpatrick P. 2009. Plerixafor. *Nat Rev Drug Discov*, 8 (2):105-106.
- Dutt A, Wong KK. 2006. Mouse Models of Lung Cancer. *Clin Cancer Res*, 12 (14):4396-4402.

- Engels EA. 2008. Inflammation in the development of lung cancer: epidemiological evidence. *Expert Rev Anticancer Ther*, 8 (4):605-615.
- Ewig S, Hecker E, Behringer D, Hrsg. 2014. Lungenkrebs. Erste Aufl. Stuttgart: Georg Thieme-Verlag.
- Fernandez EJ, Lolis E. 2002. Structure, Function, and Inhibition of Chemokines. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 42:469-499.
- Fricker SP. 2013. Physiology and Pharmacology of Plerixafor. *Transfus Med Hemother*, 40 (4):237-245.
- Fricker SP, Anastassov V, Cox J, Darkes MC, Grujic O, Idzan SR, Labrecque J, Lau G, Mosi RM, Nelson KL, Qin L, Santucci Z, Wong RS. 2006. Characterization of the molecular pharmacology of AMD3100: A specific antagonist of the G-protein coupled chemokine receptor, CXCR4. *Biochem Pharmacol*, 72 (5):588-596.
- Furusato B, Mohamed A, Uhlen M, Rhim JS. 2010. CXCR4 and Cancer. *Pathol Int*, 60 (7):497-505.
- Gazdar AF, Hirsch FR, Minna JD. 2015. From Mice to Men and Back: An Assessment of Preclinical Model Systems for the Study of Lung Cancers. *J Thorac Oncol*, 11 (3):287-299.
- Giroud F, Montmasson M. 2013. Visualization of Cell Proliferation. In: Exbrayat JM, Hrsg. *Histochemical and Cytochemical Methods of Visualization*. Erste Aufl. Boca Raton: CRC Press, 147-164.
- Goeckenjan G, Sitter H, Thomas M, Branscheid D, Flentje M, Griesinger F, Niederle N, Stuschke M, Blum T, Deppermann KM, Ficker JH, Freitag L, Lubbe AS, Reinhold T, Spath-Schwalbe E, Ukena D, Wickert M, Wolf M, Andreas S, Auberger T, Baum RP, Baysal B, Beuth J, Bickeboller H, Bocking A, Bohle RM, Bruske I, Burghuber O, Dickgreber N, Diederich S, Dienemann H, Eberhardt W, Eggeling S, Fink T, Fischer B, Franke M, Friedel G, Gauler T, Gutz S, Hautmann H, Hellmann A, Hellwig D, Herth F, Heussel CP, Hilbe W, Hoffmeyer F, Horneber M, Huber RM, Hubner J, Kauczor HU, Kirchbacher K, Kirsten D, Kraus T, Lang SM, Martens U, Mohn-Staudner A, Muller KM, Muller-Nordhorn J,

- Nowak D, Ochmann U, Passlick B, Petersen I, Pirker R, Pokrajac B, Reck M, Riha S, Rube C, Schmittel A, Schonfeld N, Schutte W, Serke M, Stamatis G, Steingraber M, Steins M, Stoelben E, Swoboda L, Teschler H, Tessen HW, Weber M, Werner A, Wichmann HE, Irlinger Wimmer E, Witt C, Worth H, German Respiratory S, German Cancer S. 2011. Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms. *Pneumologie*, 65 (1):39-59.
- Gomes NE, Brunialti MK, Mendes ME, Freudenberg M, Galanos C, Salomao R. 2010. Lipopolysaccharide-induced expression of cell surface receptors and cell activation of neutrophils and monocytes in whole human blood. *Braz J Med Biol Res*, 43 (9):853-858.
- Gottfried E, Kunz-Schughart LA, Weber A, Rehli M, Peuker A, Muller A, Kastenberger M, Brockhoff G, Andreesen R, Kreutz M. 2008. Expression of CD68 in Non-Myeloid Cell Types. *Scand J Immunol*, 67 (5):453-463.
- Hammar SP, Brambilla C, Pugatch B, Geisinger K, Fernandez EA, Vogt P, Petrovitchev N, Matsuno Y, Aisner S, Rami-Porta R, Capelozzi VL, Schmidt R, Carvalho L, Petersen I, Gazdar A, Meyerson M, Hanash SM, Jen J, Harris CC. 2004. Squamous cell carcinoma. In: Travis WD, Brambilla E, Müller-Hermelink HK, Harris CC, Hrsg. *World Health Organization Classification of Tumours Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart*. Lyon: IARC Press, 26-30.
- Hasday JD, Bascom R, Costa JJ, Fitzgerald T, Dubin W. 1999. Bacterial endotoxin is an active component of cigarette smoke. *Chest*, 115 (3):829-835.
- Hatse S, Princen K, Bridger G, De Clercq E, Schols D. 2002. Chemokine receptor inhibition by AMD3100 is strictly confined to CXCR4. *FEBS Lett*, 527 (1-3):255-262.
- Hecht SS. 1998. Biochemistry, Biology, and Carcinogenicity of Tobacco-Specific N-Nitrosamines. *Chem Res Toxicol*, 11 (6):559-603.
- Hecht SS, Stepanov I, Carmella SG. 2016. Exposure and Metabolic Activation Biomarkers of Carcinogenic Tobacco-Specific Nitrosamines. *Acc Chem Res*, 49 (1):106-114.

- Herold G. 2015. Lungenkarzinom. In: Herold G, Hrsg. Innere Medizin 40. Aufl. Köln: Gerd Herold, 399-404.
- Il'nitskaya SI, Kaledin VI, Bogdanova LA, Morozkova TS, Kapustina VI, Perepechaeva ML, Grishanova AY. 2016. Stimulation of Diethylnitrosamine Metabolism Reduces Its General Toxic and Hepatocarcinogenic Effects. *Bull Exp Biol Med*, 162 (1):98-101.
- Jung S, Aliberti J, Graemmel P, Sunshine MJ, Kreutzberg GW, Sher A, Littman DR. 2000. Analysis of Fractalkine Receptor CX3CR1 Function by Targeted Deletion and Green Fluorescent Protein Reporter Gene Insertion. *Mol Cell Biol*, 20 (11):4106-4114.
- Junker K, Petersen I. 2008. Kleinzelliges Bronchialkarzinom, Pathologie und Molekularpathologie. *Onkologe*, 14:762-773.
- Kaemmerer D, Specht E, Sanger J, Wirtz RM, Sayeg M, Schulz S, Lupp A. 2015. Somatostatin Receptors in Bronchopulmonary Neuroendocrine Neoplasms: New Diagnostic, Prognostic, and Therapeutic Markers. *J Clin Endocrinol Metab*, 100 (3):831-840.
- Kellar A, Egan C, Morris D. 2015. Preclinical Murine Models for Lung Cancer: Clinical Trial Applications. *Biomed Res Int*, 2015:621324.
- Keohavong P, Kahkonen B, Kinchington E, Yin J, Jin J, Liu X, Siegfried JM, Di YP. 2011. K-ras Mutations in Lung Tumors from NNK-treated Mice with Lipopolysaccharide-elicited Lung Inflammation. *Anticancer Res*, 31 (9):2877-2882.
- Khair OA, Davies RJ, Devalia JL. 1996. Bacterial-induced release of inflammatory mediators by bronchial epithelial cells. *Eur Respir J*, 9 (9):1913-1922.
- King JD, Kocincova D, Westman EL, Lam JS. 2009. Lipopolysaccharide biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Innate Immun*, 15 (5):261-312.
- Kurushima H, Ramprasad M, Kondratenko N, Foster DM, Quehenberger O, Steinberg D. 2000. Surface expression and rapid internalization of macrosialin

- (mouse CD68) on elicited mouse peritoneal macrophages. *J Leukoc Biol*, 67 (1):104-108.
- Lee PY, Wang JX, Parisini E, Dascher CC, Nigrovic PA. 2013. Ly6 family proteins in neutrophil biology. *J Leukoc Biol*, 94 (4):585-594.
- Leveau JH, Lindow SE. 2001. Predictive and Interpretive Simulation of Green Fluorescent Protein Expression in Reporter Bacteria. *J Bacteriol*, 183 (23):6752-6762.
- Lin G, Finger E, Gutierrez-Ramos JC. 1995. Expression of CD34 in endothelial cells, hematopoietic progenitors and nervous cells in fetal and adult mouse tissues. *Eur J Immunol*, 25 (6):1508-1516.
- Loppnow H. 2001. Zytokine: Klassifikation, Rezeptoren, Wirkungsmechanismen. *Internist (Berl)*, 42 (1):13-27.
- Maldonado RF, Sa-Correia I, Valvano MA. 2016. Lipopolysaccharide modification in Gram-negative bacteria during chronic infection. *FEMS Microbiol Rev*, 40 (4):480-493.
- Manning BD, Cantley LC. 2007. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*, 129 (7):1261-1274.
- Maser E. 2004. Significance of reductases in the detoxification of the tobacco-specific carcinogen NNK. *Trends Pharmacol Sci*, 25 (5):235-237.
- McFarland HI, Nahill SR, Maciaszek JW, Welsh RM. 1992. CD11b (Mac-1): a marker for CD8+ cytotoxic T cell activation and memory in virus infection. *J Immunol*, 149 (4):1326-1233.
- McKenney JK, Weiss SW, Folpe AL. 2001. CD31 Expression in Intratumoral Macrophages: A Potential Diagnostic Pitfall. *Am J Surg Pathol*, 25 (9):1167-1173.
- Mellado M, Rodriguez-Frade JM, Manes S, Martinez AC. 2001. Chemokine Signaling and Functional Responses: The Role of Receptor Dimerization and TK Pathway Activation. *Annu Rev Immunol*, 19:397-421.

- Meuwissen R, Berns A. 2005. Mouse models for human lung cancer. *Genes Dev*, 19 (6):643-664.
- Mirsadraee S, Oswal D, Alizadeh Y, Caulo A, van Beek E, Jr. 2012. The 7th lung cancer TNM classification and staging system: Review of the changes and implications. *World J Radiol*, 4 (4):128-134.
- Modlin IM, Gustafsson BI, Moss SF, Pavel M, Tsolakis AV, Kidd M. 2010. Chromogranin A - Biological Function and Clinical Utility in Neuro Endocrine Tumor Disease. *Ann Surg Oncol*, 17 (9):2427-2443.
- Molteni M, Gemma S, Rossetti C. 2016. The Role of Toll-Like Receptor 4 in Infectious and Noninfectious Inflammation. *Mediators Inflamm*, 2016:1-9.
- Mueller W, Schutz D, Nagel F, Schulz S, Stumm R. 2013. Hierarchical Organization of Multi-Site Phosphorylation at the CXCR4 C Terminus. *PLoS One*, 8 (5):1-13.
- Müller AM, Nesslinger M, Skipka G, Muller KM. 2002a. Expression of CD34 in Pulmonary Endothelial Cells in vivo. *Pathobiology*, 70 (1):11-17.
- Müller AM, Hermanns MI, Skrzynski C, Nesslinger M, Muller KM, Kirkpatrick CJ. 2002b. Expression of the Endothelial Markers PECAM-1, vWf, and CD34 in Vivo and in Vitro. *Exp Mol Pathol*, 72 (3):221-229.
- Nagaraju GP, Bramhachari PV, Raghu G, El-Rayes BF. 2015. Hypoxia inducible factor-1alpha: Its role in colorectal carcinogenesis and metastasis. *Cancer Lett*, 366 (1):11-18.
- Nagasawa T. 2014. CXC chemokine ligand 12 (CXCL12) and its receptor CXCR4. *J Mol Med (Berl)*, 92 (5):433-439.
- Nagase H, Miyamasu M, Yamaguchi M, Imanishi M, Tsuno NH, Matsushima K, Yamamoto K, Morita Y, Hirai K. 2002. Cytokine-mediated regulation of CXCR4 expression in human neutrophils. *J Leukoc Biol*, 71 (4):711-717.
- Neel NF, Schutyser E, Sai J, Fan GH, Richmond A. 2005. Chemokine receptor internalization and intracellular trafficking. *Cytokine Growth Factor Rev*, 16 (6):637-658.

- Olias G, Viollet C, Kusserow H, Epelbaum J, Meyerhof W. 2004. Regulation and function of somatostatin receptors. *J Neurochem*, 89 (5):1057-1091.
- Parzefall W, Schulte-Hermann R. 2010. Mehrstufenprozess der Kanzerogenese und chemische Kanzerogenese. In: Hiddemann W, Bartram CR, Hrsg. *Die Onkologie, Teil 1: Allgemeiner Teil*. Zweite Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 181-223.
- Petersen I. 2010. Morphologische und molekulare Pathologie des Lungenkarzinoms. *Pathologe*, 31 (2):204-210.
- Petersen I, Warth A. 2014. Karzinome der Lunge. Entwicklungen, Konzepte und Ausblick auf die neue WHO-Klassifikation. *Pathologe*, 35 (6):547-556.
- Petruzzello-Pellegrini TN, Yuen DA, Page AV, Patel S, Soltyk AM, Matouk CC, Wong DK, Turgeon PJ, Fish JE, Ho JJ, Steer BM, Khajoo V, Tigdi J, Lee WL, Motto DG, Advani A, Gilbert RE, Karumanchi SA, Robinson LA, Tarr PI, Liles WC, Brunton JL, Marsden PA. 2012. The CXCR4/CXCR7/SDF-1 pathway contributes to the pathogenesis of Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome in humans and mice. *J Clin Invest*, 122 (2):759-776.
- Prasse A, Waller C, Passlick B, Müller-Quernheim J. 2010. Lungenkrebs aus Sicht der Inneren Medizin und Chirurgie. *Radiologe*, 50 (8):662-668.
- Pusztaszeri MP, Seelentag W, Bosman FT. 2006. Immunohistochemical Expression of Endothelial Markers CD31, CD34, von Willebrand Factor, and Fli-1 in Normal Human Tissues. *J Histochem Cytochem*, 54 (4):385-395.
- Reubi JC, Waser B, Schaer JC, Laissue JA. 2001. Somatostatin receptor sst1-sst5 expression in normal and neoplastic human tissues using receptor autoradiography with subtype-selective ligands. *Eur J Nucl Med*, 28 (7):836-846.
- Ridge CA, McErlean AM, Ginsberg MS. 2013. Epidemiology of lung cancer. *Semin Intervent Radiol*, 30 (2):93-98.
- RKI, GEKID. 2013. Krebs in Deutschland 2009/2010. Neunte Aufl. Berlin: Robert Koch-Institut.

- RKI, GEKID. 2015. Krebs in Deutschland 2011/2012. Zehnte Aufl. Berlin: Robert Koch-Institut.
- Salcedo R, Wasserman K, Young HA, Grimm MC, Howard OM, Anver MR, Kleinman HK, Murphy WJ, Oppenheim JJ. 1999. Vascular Endothelial Growth Factor and Basic Fibroblast Growth Factor Induce Expression of CXCR4 on Human Endothelial Cells: In Vivo Neovascularization Induced by Stromal-Derived Factor-1 α . *Am J Pathol*, 154 (4):1125-1135.
- Sayeg Y, Sayeg M, Baum RP, Kulkarni HR, Presselt N, Mader I, Kunze A, Sanger J, Horsch D, Bonnet R. 2014. Neuroendokrine Neoplasien der Lunge. *Pneumologie*, 68 (7):456-477.
- Schindelin J, Rueden CT, Hiner MC, Eliceiri KW. 2015. The ImageJ Ecosystem: An Open Platform for Biomedical Image Analysis. *Mol Reprod Dev*, 82 (7-8):518-529.
- Schioppa T, Uranchimeg B, Sacconi A, Biswas SK, Doni A, Rapisarda A, Bernasconi S, Sacconi S, Nebuloni M, Vago L, Mantovani A, Melillo G, Sica A. 2003. Regulation of the Chemokine Receptor CXCR4 by Hypoxia. *J Exp Med*, 198 (9):1391-1402.
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*, 9 (7):671-675.
- Scholzen T, Gerdes J. 2000. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*, 182 (3):311-322.
- Scozzafava A, Mastrolorenzo A, Supuran CT. 2002. Non-peptidic Chemokine Receptors Antagonists as Emerging Anti-HIV Agents. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 17 (2):69-76.
- Serafini P, De Santo C, Marigo I, Cingarlini S, Dolcetti L, Gallina G, Zanovello P, Bronte V. 2004. Derangement of immune responses by myeloid suppressor cells. *Cancer Immunol Immunother*, 53 (2):64-72.
- Simonato L, Agudo A, Ahrens W, Benhamou E, Benhamou S, Boffetta P, Brennan P, Darby SC, Forastiere F, Fortes C, Gaborieau V, Gerken M, Gonzales CA, Jockel

- KH, Kreuzer M, Merletti F, Nyberg F, Pershagen G, Pohlabein H, Rosch F, Whitley E, Wichmann HE, Zambon P. 2001. Lung cancer and cigarette smoking in Europe: an update of risk estimates and an assessment of inter-country heterogeneity. *Int J Cancer*, 91 (6):876-887.
- Singh S, Singh UP, Grizzle WE, Lillard JW, Jr. 2004. CXCL12-CXCR4 interactions modulate prostate cancer cell migration, metalloproteinase expression and invasion. *Lab Invest*, 84 (12):1666-1676.
- Song G, Ouyang G, Bao S. 2005. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med*, 9 (1):59-71.
- Tan SM, Hyland RH, Al-Shamkhani A, Douglass WA, Shaw JM, Law SK. 2000. Effect of Integrin $\beta 2$ Subunit Truncations on LFA-1 (CD11a/CD18) and Mac-1 (CD11b/CD18) Assembly, Surface Expression, and Function. *J Immunol*, 165 (5):2574-2581.
- Teicher BA, Fricker SP. 2010. CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 Pathway in Cancer. *Clin Cancer Res*, 16 (11):2927-2931.
- Tran PB, Banisadr G, Ren D, Chenn A, Miller RJ. 2007. Chemokine Receptor Expression by Neural Progenitor Cells in Neurogenic Regions of Mouse Brain. *J Comp Neurol*, 500 (6):1007-1033.
- Travis W, Nicholson S, Hirsch FR, Pugatch B, Geisinger K, Brambilla E, Gazdar A, Petersen I, Meyerson M, Hanash SM, Jen J, Takahashi T, Fernandez EA, Capron F. 2004. Small Cell Carcinoma. In: Travis WD, Brambilla E, Müller-Hermelink HK, Harris CC, Hrsg. *World Health Organization Classification of Tumours Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart*. Lyon: IARC Press, 31-34.
- Vandercappellen J, Van Damme J, Struyf S. 2008. The role of CXC chemokines and their receptors in cancer. *Cancer Lett*, 267 (2):226-244.
- Vernooy JH, Dentener MA, van Suylen RJ, Buurman WA, Wouters EF. 2002. Long-Term Intratracheal Lipopolysaccharide Exposure in Mice Results in Chronic Lung Inflammation and Persistent Pathology. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 26 (1):152-159.

- Weitzman SA, Gordon LI. 1990. Inflammation and Cancer: Role of Phagocyte-generated Oxidants in Carcinogenesis. *Blood*, 76 (4):655-663.
- Wong RS, Bodart V, Metz M, Labrecque J, Bridger G, Fricker SP. 2008. Comparison of the Potential Multiple Binding Modes of Bicyclam, Monocyclam, and Noncyclam Small-Molecule CXC Chemokine Receptor 4 Inhibitors. *Mol Pharmacol*, 74 (6):1485-1495.
- Wu B, Chien EY, Mol CD, Fenalti G, Liu W, Katritch V, Abagyan R, Brooun A, Wells P, Bi FC, Hamel DJ, Kuhn P, Handel TM, Cherezov V, Stevens RC. 2010. Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists. *Science*, 330 (6007):1066-1071.
- Xu L, Li Y, Sun H, Li D, Hou T. 2013. Structural basis of the interactions between CXCR4 and CXCL12/SDF-1 revealed by theoretical approaches. *Mol Biosyst*, 9 (8):2107-2117.
- Yu L, Cecil J, Peng SB, Schrementi J, Kovacevic S, Paul D, Su EW, Wang J. 2006. Identification and expression of novel isoforms of human stromal cell-derived factor 1. *Gene*, 374:174-179.

9 Anhang

9.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Chemische Strukturformeln des Bicyclams AMD3100 (Plerixafor) und des Monocyclams AMD3465	21
Abbildung 2:	Chemische Strukturformeln von Nikotin und des vom Nikotin-abgeleiteten Nitrosamin-Ketons (NNK)	25
Abbildung 3:	Darstellung der Gabe von LPS, NNK und AMD3100	29
Abbildung 4:	Übersicht über die im Pilotversuch angewandten Untersuchungsmethoden sowie die jeweils dargestellten Markerproteine	44
Abbildung 5:	Entwicklung der Tiergewichte von mit NNK und LPS behandelten <i>Cxcr4-eGFP</i> -BAC-Mäusen während der 17-wöchigen Behandlungszeit sowie der Tiergewichte entsprechender Kontrolltiere ohne Behandlung mit NNK und LPS	45
Abbildung 6:	Makroskopische Darstellung der Lungentumoren sowie der natürlichen Fluoreszenz von (Tumor-)Zellen durch die Expression des grün fluoreszierenden Proteins einer mit NNK und LPS behandelten <i>Cxcr4-eGFP</i> -BAC-Maus	46
Abbildung 7:	Mikroskopische Darstellung der Lungentumoren von mit NNK und LPS behandelten <i>Cxcr4-eGFP</i> -BAC-Mäusen	47
Abbildung 8:	Nachweis der CXCR4-Expression unter Verwendung des Antikörpers UMB-2 ohne LPP-Behandlung, mit LPP-Behandlung sowie eGFP-Expression in Lungentumoren von mit NNK und LPS behandelten <i>Cxcr4-eGFP</i> -BAC-Mäusen	49
Abbildung 9:	CXCL12/SDF-1-Expression in Lungentumoren von mit NNK und LPS behandelten <i>Cxcr4-eGFP</i> -BAC-Mäusen	50
Abbildung 10:	CD34-Expression in Lungentumoren von mit NNK und LPS behandelten <i>Cxcr4-eGFP</i> -BAC-Mäusen	51
Abbildung 11:	CgA-Expression in Lungentumoren von mit NNK und LPS behandelten <i>Cxcr4-eGFP</i> -BAC-Mäusen	52

Abbildung 12:	Ki-67-Expression in Lungentumoren von mit NNK und LPS behandelten <i>Cxcr4-eGFP</i> -BAC-Mäusen	53
Abbildung 13:	SSTR2-Expression in Lungentumoren von mit NNK und LPS behandelten <i>Cxcr4-eGFP</i> -BAC-Mäusen	54
Abbildung 14:	Nachweis der CXCR4-Expression unter Verwendung des Antikörpers UMB-2 ohne LPP-Behandlung, mit LPP-Behandlung und des Antikörpers 2B11 in Lungentumoren von mit NNK und LPS behandelten <i>Cxcr4-eGFP</i> -BAC-Mäusen	56
Abbildung 15:	CXCL12/SDF-1-Expression in Lungentumoren von mit NNK und LPS behandelten <i>Cxcr4-eGFP</i> -BAC-Mäusen	58
Abbildung 16:	Expression von CD11b, CD31, CD68 und Gr-1 in Lungentumoren von mit NNK und LPS behandelten <i>Cxcr4-eGFP</i> -BAC-Mäusen	60
Abbildung 17:	CD34-Expression in Lungentumoren von mit NNK und LPS behandelten <i>Cxcr4-eGFP</i> -BAC-Mäusen	61
Abbildung 18:	Ki-67-Expression in Lungentumoren von mit NNK und LPS behandelten <i>Cxcr4-eGFP</i> -BAC-Mäusen	62
Abbildung 19:	Gewebespezifischer Nachweis der <i>Cxcr4</i> -mRNA und der <i>Cxcl12/SDF-1</i> -mRNA in Lungentumoren von mit NNK und LPS behandelten <i>Cxcr4-eGFP</i> -BAC-Mäusen	64
Abbildung 20:	Entwicklung der Tiergewichte von nur mit LPS behandelten <i>Cxcr4-eGFP</i> -BAC-Mäusen während der 17-wöchigen Behandlungszeit	65
Abbildung 21:	Hämatoxylin-Eosin-Übersichtsfärbung, CXCL12/SDF-1-Expression und Nachweis der CXCR4-Expression unter Verwendung des Antikörpers UMB-2 ohne LPP-Behandlung sowie mit LPP-Behandlung in Lungentumoren von mit LPS behandelten <i>Cxcr4-eGFP</i> -BAC-Mäusen	66

Abbildung 22:	Übersicht über die im Hauptversuch angewandten Untersuchungsmethoden sowie die jeweils dargestellten Markerproteine	67
Abbildung 23:	Entwicklung der Tiergewichte von mit NNK und LPS beziehungsweise mit NNK, LPS und AMD3100 behandelten <i>Cxcl12-Cxcl12RFP/Cxcr4-eGFP</i> -BAC-Mäusen während der 19-wöchigen Behandlungszeit sowie der Tiergewichte entsprechender Kontrolltiere ohne Behandlung mit NNK, LPS und AMD3100	68
Abbildung 24:	Mikroskopische Darstellung der Lungentumoren von mit NNK und LPS beziehungsweise mit NNK, LPS und AMD3100 behandelten <i>Cxcl12-Cxcl12RFP/Cxcr4-eGFP</i> -BAC-Mäusen	69
Abbildung 25:	Nachweis der CXCR4-Expression unter Verwendung des Antikörpers UMB-2 ohne LPP-Behandlung und mit LPP-Behandlung in Lungentumoren von mit NNK und LPS beziehungsweise mit NNK, LPS und AMD3100 behandelten <i>Cxcl12-Cxcl12RFP/Cxcr4-eGFP</i> -BAC-Mäusen	71
Abbildung 26:	eGFP-Expression in Lungentumoren von mit NNK und LPS beziehungsweise mit NNK, LPS und AMD3100 behandelten <i>Cxcl12-Cxcl12RFP/Cxcr4-eGFP</i> -BAC-Mäusen	72
Abbildung 27:	CXCL12/SDF-1-Expression in Lungentumoren von mit NNK und LPS beziehungsweise mit NNK, LPS und AMD3100 behandelten <i>Cxcl12-Cxcl12RFP/Cxcr4-eGFP</i> -BAC-Mäusen	73
Abbildung 28:	CD34-Expression in Lungentumoren von mit NNK und LPS beziehungsweise mit NNK, LPS und AMD3100 behandelten <i>Cxcl12-Cxcl12RFP/Cxcr4-eGFP</i> -BAC-Mäusen	74
Abbildung 29:	CgA-Expression in Lungentumoren von mit NNK und LPS beziehungsweise mit NNK, LPS und AMD3100 behandelten <i>Cxcl12-Cxcl12RFP/Cxcr4-eGFP</i> -BAC-Mäusen	75

Abbildung 30:	Ki-67-Expression in Lungentumoren von mit NNK und LPS beziehungsweise mit NNK, LPS und AMD3100 behandelten <i>Cxcl12-Cxcl12RFP/Cxcr4-eGFP-BAC</i> -Mäusen	76
Abbildung 31:	SSTR2-Expression in Lungentumoren von mit NNK und LPS beziehungsweise mit NNK, LPS und AMD3100 behandelten <i>Cxcl12-Cxcl12RFP/Cxcr4-eGFP-BAC</i> -Mäusen	77
Abbildung 32:	Nachweis der CXCR4-Expression unter Verwendung des Antikörpers UMB-2 ohne LPP-Behandlung, mit LPP-Behandlung und CXCL12/SDF-1-Expression in Lungentumoren von mit NNK und LPS behandelten <i>Cxcl12-Cxcl12RFP/Cxcr4-eGFP-BAC</i> -Mäusen	80
Abbildung 33:	Nachweis der CXCR4-Expression unter Verwendung des Antikörpers UMB-2 ohne LPP-Behandlung, mit LPP-Behandlung und CXCL12/SDF-1-Expression in Lungentumoren von mit NNK, LPS und AMD3100 behandelten <i>Cxcl12-Cxcl12RFP/Cxcr4-eGFP-BAC</i> -Mäusen	81
Abbildung 34:	Expression von CD11b, CD31, CD68 in Lungentumoren von mit NNK und LPS beziehungsweise mit NNK, LPS und AMD3100 behandelten <i>Cxcl12-Cxcl12RFP/Cxcr4-eGFP-BAC</i> -Mäusen	84
Abbildung 35:	Expression von Gr-1 und CD34 in Lungentumoren von mit NNK und LPS beziehungsweise mit NNK, LPS und AMD3100 behandelten <i>Cxcl12-Cxcl12RFP/Cxcr4-eGFP-BAC</i> -Mäusen	85
Abbildung 36:	Expression von Ki-67 in Lungentumoren von mit NNK und LPS beziehungsweise mit NNK, LPS und AMD3100 behandelten <i>Cxcl12-Cxcl12RFP/Cxcr4-eGFP-BAC</i> -Mäusen	86

9.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	T0- bis T4-Staging des Bronchialkarzinoms	5
Tabelle 2:	Krankheitsstadien des Bronchialkarzinoms entsprechend der TNM-Klassifikation	6
Tabelle 3:	Art und Herkunft verwendeter Chemikalien	30
Tabelle 4:	Übersicht über verwendete Lösungen und deren Herstellung	31
Tabelle 5:	Übersicht über verwendete Primärantikörper	33
Tabelle 6:	Art und Herkunft verwendeter Primärantikörper	33
Tabelle 7:	Art und Herkunft verwendeter Geräte und Verbrauchsmaterialien	34
Tabelle 8:	Protokoll zur immunhistochemischen Färbung von Paraffinschnitten	36
Tabelle 9:	Protokoll zur Hämatoxylin-Eosin-Übersichtsfärbung	38
Tabelle 10:	Protokoll zur Free-Floating-Methode	40
Tabelle 11:	Protokoll zur Prähybridisierung	42
Tabelle 12:	Protokoll zur Durchführung stringenter Waschschrte	42

9.3 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Frau apl. Prof. Dr. Amelie Lupp, Herr Dr. Philipp Abe.

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

9.4 Danksagung

Mein Dank gilt an erster Stelle Frau apl. Prof. Dr. Amelie Lupp. Durch Ihr außerordentlich liebevolles Auftreten und ihr fürsorgliches Engagement hat Sie maßgeblich zur Erstellung dieser Arbeit beigetragen. Ich danke ihr für das Ermöglichen der Bearbeitung dieses interessanten Themas, angenehme Stunden der Zusammenarbeit und ihre Unterstützung.

Weiterhin ist allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie in Jena, insbesondere Herrn Prof. Dr. Ralf Stumm sowie Herrn Dr. Philipp Abe, zu danken.

Schließlich bedanke ich mich bei all denen, die mir auf meinem Lebensweg stets beistanden und mich ermutigt haben.